

ENZYMATISCH AKTIVIERBARE BIOKONJUGATE ALS OBERFLÄCHENSPEZIFISCHE ADHÄSIVE

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Maria Meißler

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Prof. Dr. Hans G. Börner
2. Prof. Stefan Hecht, Ph.D.
3. Prof. Dr. Daniel Klinger (Freie Universität Berlin)

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans G. Börner am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Zeit von Februar 2012 bis September 2016 angefertigt.

Für meine Familie

ABSTRACT

Biomacromolecule responsiveness to external stimuli is a key principle embedded in living systems to regulate vital processes and serves as model for developing new switchable materials. Compounds arise from synthetic chemistry such as, for example, polymers cannot fully meet this complex interaction of structure and function. Stimuli-responsive peptide-polymer conjugates provide a promising approach for solving this problem. Activating their functional properties by means of enzymes as stimuli is becoming increasingly important in scientific and industrial research.

The present study has shown that enzyme-responsive peptide-poly(ethylene glycol) (peptide-PEG) conjugates can be efficiently biotransformed to create protein-resistant coatings. The surface-specific adsorption of a linear bioconjugate is temporarily suppressed by extending a titanium dioxide adhesion domain known from literature with a proteolytically cleavable recognition site and a suitable interfering domain. From a series of differently modified bioconjugates, an anionic interfering domain was identified as particularly effective to suppress adhesive functions. The enzymatic processing of the non-binding precursor with a specific cysteine protease derived from tobacco etch virus (TEV protease) resulted in the separation of the introduced modification. The adhesive properties of the polymer-bound binding sequence were reproduced by the biotransformation process. The activated bioconjugate allowed the non-covalent PEGylation of the metal oxide surface. The concept was applied to divalent peptide-PEG conjugates using branched adhesion domains and extended interfering domains. The proteolytically activated dimer coating showed increased stability against dilution compared to the linear bioconjugate and demonstrated promising antifouling properties against the non-specific adsorption of a model protein for human blood serum proteins to titanium dioxide surfaces.

For a quantitative interpretation of enzymatically activable surface adhesion based on the adhesion domain, elastic poly(ethylene glycol) hydrogel particles were used as affinity biosensor systems. The covalent immobilization of an enzyme-responsive sequence to the particles via a selective ligation reaction allowed their processing by means of the TEV protease. Reflection interference contrast microscopy measurements of the biotransformed peptide hydrogel probes enabled the quantification of the adhesive interactions of the enzyme-induced activation process.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Die stimuliresponsiven Eigenschaften von Biomakromolekülen zur Regulierung lebenswichtiger Prozesse in lebenden Systemen dienen als Vorbild für die Entwicklung neuer schaltbarer Materialien. Rein synthetische Verbindungen wie beispielsweise Polymere können diesem komplexen Zusammenwirken von Struktur und Funktion jedoch nicht in vollem Umfang gerecht werden. Stimuliresponsive Peptid-Polymer-Konjugate bieten eine vielversprechende Lösung zur Überwindung dieser Problematik. Deren funktionale Eigenschaften durch Enzyme als Stimuli zu aktivieren findet in der wissenschaftlichen und industriellen Forschung immer mehr Beachtung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass enzymresponsive Peptid-Poly(ethylenglycol)-Konjugate (Peptid-PEG-Konjugate) effizient biotransformiert und proteinresistente Beschichtungen ausbilden können. Die oberflächenspezifische Haftung eines linearen Biokonjugates auf Basis einer literaturbekannten Adhäsionsdomäne für Titandioxid-Oberflächen wurde durch die Verlängerung mit einer proteolytisch spaltbaren Erkennungssequenz und einer Suppressionsdomäne temporär unterbunden. Aus einer Serie unterschiedlich modifizierter Biokonjugate wurde eine anionische Suppressionsdomäne als besonders leistungsfähige haftungsunterdrückende Einheit identifiziert. Die Prozessierung des nicht-bindenden Vorläufers mit einer spezifischen Cysteinprotease hervorgehend aus dem Tabakäzvirus (TEV Protease) bewirkte die Abtrennung der eingeführten Modifikation. Durch die Biotransformation wurden die Haftungseigenschaften der polymergebundenen Adhäsionsdomäne zurückgebildet. Das aktivierte Biokonjugat ermöglichte die nicht-kovalente PEGylierung der Metalloxid-Oberfläche. Das Konzept wurde auf divalente Peptid-PEG-Konjugate unter Verwendung verzweigter Adhäsionsdomänen und verlängerter Suppressionsdomänen übertragen. Die Beschichtung des proteolytisch aktivierten Dimeres zeigte eine erhöhte Stabilität im Vergleich zum linearen Biokonjugat und demonstrierte vielversprechende Antifouling-Eigenschaften gegenüber der unspezifischen Adsorption eines Modellproteins für Serumproteine des menschlichen Blutes auf Titandioxid-Oberflächen.

Für eine quantitative Interpretation enzymatisch aktivierbaren Oberflächenhaftung auf Basis der Adhäsionsdomäne wurden elastische Poly(ethylenglycol)-Hydrogelpartikel als Affinitätsbiosensor-Systeme verwendet. Die kovalente Immobilisierung einer enzymresponsiven Vorläufersequenz an die Partikel über eine selektive Ligationsreaktion erlaubte deren Prozessierung mittels der TEV Protease. Interferenzmikroskopische Messungen der biotransformierten Peptid-Hydrogelsonden ermöglichten die Quantifizierung der adhäsiven Wechselwirkungen des enzyminduzierten Aktivierungsprozesses.

INHALTSVERZEICHNIS

1	MOTIVATION UND ZIELSTELLUNG.....	1
2	STAND DER FORSCHUNG	3
2.1	Die Integration stimuliresponsiver Peptide in synthetische Polymere	3
2.2	Strategien zur Darstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten	5
2.2.1	KONVERGENTE UND DIVERGENTE SYNTHESESTRATEGIEN IM ÜBERBLICK	5
2.2.2	THIOL-MALEINIMID-LIGATION	6
2.2.3	DIE INVERSE KONJUGATIONSSTRATEGIE.....	7
2.3	Klassifizierung und Wirkmechanismen materialwissenschaftlich relevanter Stimuli.....	8
2.4	Enzymresponsive Peptid-Polymer-Konjugate	10
2.4.1	ENTWICKLUNG UND BEDEUTUNG ENZYMRESPONSIVER BIOKONJUGATE	11
2.4.2	SPEZIFISCHE PROTEASEN FÜR MEDIZINISCHE UND MATERIALWISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN.....	14
2.5	Peptid-Polymer-Konjugate als proteinresistente Beschichtungen.....	17
2.5.1	ANTIFOULING-STRATEGIEN.....	18
2.5.2	PEPTID-PEG-KONJUGATE ZUR PRÄVENTION VON BIOFOULING	19
2.6	Peptidbasierte Adhäsionsdomänen für Titandioxid-Oberflächen	21
2.6.1	MULTIVALENTE OBERFLÄCHENSPEZIFISCHE ADHÄSIVE	21
2.6.2	DAS TITANBINDENDE PEPTID.....	22
2.7	Aufklärung adhäsiver Wechselwirkungen zwischen biomakromolekularen Strukturen und Oberflächen	24
2.7.1	QUARZKRISTALL-MIKROWAAGE MIT DISSIPATIONS-AUFZEICHNUNG	24
2.7.2	REFLEXIONSKONTRASTMIKROSKOPIE FÜR MECHANISCH VERFORMBARE HYDROGELSONDEN	26
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	29
3.1	Enzymatisch aktivierbare Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten	29
3.1.1	ENTWICKLUNG UND IDENTIFIZIERUNG GEEIGNETER SUPPRESSIONSDOMÄNEN	29
3.1.2	ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG NICHT-BINDENDER PEPTID-PEG-KONJUGATE	33
3.1.2.1	Entwicklung eines Aktivierungsprotokolls.....	33
3.1.2.2	Reinheitsbestimmung von Peptid-PEG-Konjugaten.....	35
3.1.2.3	Effizienz der Aktivierung in Abhängigkeit von Substrat- und Enzymkonzentration	36
3.1.2.4	Enzymkinetische Untersuchungen	39
3.1.3	ADSORPTIONSVERHALTEN AUF TITANDIOXID-OBERFLÄCHEN.....	42
3.1.3.1	Enzymatisch aktivierte Adsorption des nicht-bindenden Peptid-PEG-Konjugates	42
3.1.3.2	Enzymabhängige Adsorption des adhäsiven Peptid-PEG-Konjugates.....	44
3.1.3.3	Einfluss der Cysteinprotease auf die enzymatisch generierte Beschichtung	49

3.1.4	MASSENBESTIMMUNG NACH SAUERBREY UND VOIGT	51
3.1.5	ANTIFOULING-EIGENSCHAFTEN DER SYNTHETISCHEN BIOKONJUGAT-BESCHICHTUNG	53
3.1.6	ADSORPTIONSVERHALTEN DIVALENTER PEPTID-PEG-KONJUGATE.....	56
3.1.7	ANTIFOULING-EIGENSCHAFTEN DER DIMER-BESCHICHTUNG	60
3.1.8	UNTERDRÜCKUNG DER ADHÄSIVEN EIGENSCHAFTEN DES VERZWEIGTEN DIMERES.....	61
3.1.9	CHARAKTERISIERUNG DER MOLEKULAREN BINDUNG NACH LANGMUIR.....	63
3.1.10	ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG DES SCHWACH-BINDENDEN DIMERES	65
3.1.11	ENZYMATISCH AKTIVIERTE ADSORPTION DES SCHWACH-BINDENDEN DIMERES	68
3.1.12	ADSORBIERTE MASSEN NACH SAUERBREY UND VOIGT	72
3.1.13	ANTIFOULING-EIGENSCHAFTEN DER BESCHICHTUNG DES AKTIVIERTEN DIMERES	74
3.1.14	TEILZUSAMMENFASSUNG.....	75
3.2	Lichtaktivierbare Photoschalter als Alternative zur enzymatisch induzierten Adsorption von Peptid-Polymer-Konjugaten.....	77
3.3	Elastische Hydrogelpartikel als Biosensor-Systeme für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen.....	83
3.3.1	PEG-SCPs ZUR SELEKTIVEN IMMOBILISIERUNG BIOMAKROMOLEKULARER STRUKTUREN	83
3.3.2	MALEINIMID-FUNKTIONALISIERTE PEG-SCPs ALS MECHANISCHE SONDEN FÜR ENZYMATISCH AKTIVIERBARE ADHÄSIONSDOMÄNEN	85
3.3.3	IMMOBILISIERUNG ENZYMATISCH AKTIVIERBARER ADHÄSIONSDOMÄNEN	87
3.3.3.1	<i>Strategien zur Steuerung der Peptidbeladung Maleinimid-funktionalisierter PEG-SCPs</i>	<i>87</i>
3.3.3.2	<i>Entwicklung einer experimentellen Prozedur</i>	<i>88</i>
3.3.3.3	<i>Quantifizierung von Peptidbeladung und Funktionalisierungsgrad</i>	<i>90</i>
3.3.4	ADHÄSIONSENERGIEN ENZYMATISCH AKTIVIERTER ADHÄSIONSDOMÄNEN	93
3.3.5	TEILZUSAMMENFASSUNG.....	97
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	99
5	EXPERIMENTELLER TEIL	103
5.1	Chemikalien und Materialien	103
5.1.1	FESTPHASENGEBUNDENE SYNTHESE DER PEPTIDE UND PEPTID-PEG-KONJUGATE.....	103
5.1.2	ORGANISCH-PRÄPARATIVE SYNTHESSEN	104
5.1.3	AUFREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG	104
5.1.4	ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG.....	104
5.1.5	QUARZKRISTALL-MIKROWAAGE MIT DISSIPATIONSAUFZEICHUNG (QCM-D)	104
5.1.6	FUNKTIONALISIERUNG DER PEG-MIKROPARTIKEL	104
5.2	Instrumente und Methoden	105
5.2.1	FESTPHASENGEBUNDENE SYNTHESE DER PEPTIDE UND PEPTID-PEG-KONJUGATE.....	105
5.2.2	SEMIPRÄPARATIVE HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	105
5.2.3	ANALYTISCHE HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	105
5.2.4	ANALYTISCHE ULTRAHOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT MASSENSPEKTROMETRIE (UHPLC-MS)	106

5.2.5	MATRIX-UNTERSTÜTZTE LASER-DESORPTION/IONISATION MIT FLUGZEITMASSENSPEKTROMETER-DETEKTION (MALDI-ToF-MS)	106
5.2.6	FOURIER-TRANSFORM-INFRAROTSPEKTROSKOPIE (FT-IR)	106
5.2.7	KERNMAGNETISCHE RESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)	106
5.2.8	FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE.....	107
5.2.9	ZENTRIFUGATION	107
5.2.10	LYOPHILISATION.....	107
5.2.11	TEMPERIERTE REAKTIONSANSÄTZE IM MIKROMAßSTAB	107
5.3	Protokolle und allgemeine Arbeitsvorschriften	108
5.3.1	FESTPHASENGEBUNDENE SYNTHESE DER PEPTIDE UND PEPTID-PEG-KONJUGATE.....	108
5.3.1.1	<i>Protokoll 1: Automatisierte Synthese der Peptide.....</i>	108
5.3.1.2	<i>Protokoll 2: Automatisierte und manuelle Synthese der linearen Peptid-PEG-Konjugate</i>	109
5.3.1.3	<i>Protokoll 3: Automatisierte und manuelle Synthese der verzweigten Peptid-PEG-Konjugate.....</i>	109
5.3.1.4	<i>Protokoll 4: Abspaltung und Entschüttung der Peptide ohne Cystein</i>	110
5.3.1.5	<i>Protokoll 5: Abspaltung und Entschüttung der Peptide mit Cystein</i>	110
5.3.1.6	<i>Protokoll 6: Abspaltung und Entschüttung der Peptid-PEG-Konjugate</i>	111
5.3.2	ANALYSE VON PEPTID-PEG-KONJUGATEN MITTELS CNBR-SPALTUNG ^[273]	111
5.3.2.1	<i>Protokoll 7: Prozedur zur CNBr-Spaltung^[273]</i>	111
5.3.2.2	<i>Mögliche Nebenreaktionen während der CNBr-Spaltung</i>	111
5.3.3	QUARZKRISTALL-MIKROWAAGE MIT DISSIPATIONSAUFZEICHNUNG (QCM-D).....	112
5.3.3.1	<i>Protokoll 8: Allgemeine Messvorschrift QCM-D</i>	112
5.3.3.2	<i>Protokoll 9: Reinigung der piezoelektrischen Sensorkristalle^[373]</i>	113
5.3.3.3	<i>Protokoll 10: Adsorbierte Massen nach SAUERBREY für rigide Beschichtungen</i>	114
5.3.3.4	<i>Protokoll 11: Schichtdicken und adsorbierte Massen nach VOIGT für viskoelastische Beschichtungen</i>	114
5.4	Präparative Synthesen der nicht natürlichen Aminosäuren	116
5.4.1	SYNTHESE VON N_{α} -FMOC- N_{ϵ} -(2-[2-(2-METHOXYETHOXY)ETHOXY]ACETYL)-L-LYSIN (FMOC- K^{EOG})	116
5.4.1.1	<i>N-Hydroxysuccinimidyl-2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetat (OEG-OSu)^[377]</i>	116
5.4.1.2	<i>N_{α}-Boc-N_{ϵ}-(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetyl)-L-Lysin (Boc-K^{EOG})^[377]</i>	116
5.4.1.3	<i>N_{α}-Fmoc-N_{ϵ}-(2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetyl)-L-Lysin (Fmoc-K^{EOG})^[378]</i>	117
5.4.2	SYNTHESE VON N_{α} -FMOC-4-(2-[2-(2-AMINOETHOXY)ETHOXY]ETHYLAMINO)-4- OXOBUTANSÄURE (FMOC-OEG-COOH) ^[351, 352]	118
5.5	Charakterisierung der Peptide und Peptid-PEG-Konjugate	120
5.5.1	AC-(EG) ₂ -ENLYFQ-CONH ₂ (IF ^{4CHEM})	120
5.5.2	AC-(EG) ₄ -ENLYFQ-CONH ₂ (IF ^{7CHEM})	120
5.5.3	RHB-(EG) ₂ -ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-[OEG] ₂ -C-CONH ₂ (PEP ^{RHB})	121
5.5.4	H ₂ N-G-RKLPDAPGMHTW-[OEG] ₂ -C-CONH ₂ (PEP ^{TBP})	122

5.5.5	G-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (G-TBP-PEG ^{CHEM}).....	123
5.5.6	Ac-KG-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S1-PEG)	124
5.5.7	Ac-(KG) ₂ -ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S2-PEG).....	124
5.5.8	Ac-EG-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S3-PEG).....	125
5.5.9	Ac-(EG) ₂ -ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S4-PEG)	126
5.5.9.1	Reinheitsbestimmung von S4-PEG durch CNBr-Spaltung	126
5.5.10	Ac-K ^{EOEG} G-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S5-PEG)	130
5.5.11	Ac-(K ^{EOEG} G) ₂ -ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S6-PEG)	130
5.5.12	Ac-G-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (EPITOP-TBP-PEG).....	131
5.5.13	(G-RKLPDAPGMHTW) ₂ -BLOCK-PEG ((G-TBP) ₂ -PEG ^{CHEM})	132
5.5.14	(G-RKLPDAPGMHTW) ₂ K-BLOCK-PEG ((G-TBP) ₂ K-PEG ^{CHEM})	133
5.5.15	Ac-(EG) ₂ -ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW) ₂ K-BLOCK-PEG ((S4) ₂ K-PEG).....	133
5.5.16	Ac-(EG) ₄ -ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW) ₂ K-BLOCK-PEG ((S7) ₄ K-PEG)	134
5.5.16.1	Reinheitsbestimmung durch CNBr-Spaltung	135
5.6	Enzymatische Aktivierung von Peptid-PEG-Konjugaten	140
5.6.1	ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG VON S4-PEG	140
5.6.1.1	Inhibierung der TEV Protease-Aktivität der Enzymcharge #1	140
5.6.1.2	Identifizierung der Proteolyseprodukte G-TBP-PEG^{ENZ} und IF4^{ENZ}	141
5.6.1.3	Quantifizierung und Kalibrierung	142
5.6.2	ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG VON (S7) ₂ K-PEG.....	142
5.6.2.1	Inhibierung der TEV Protease-Aktivität der Enzymcharge #2	143
5.6.2.2	Identifizierung des Proteolyseproduktes IF7^{ENZ}	144
5.6.2.3	Quantifizierung und Kalibrierung	144
5.7	QCM-D-Messungen	146
5.7.1	ADSORPTIONSVERHALTEN VON G-TBP-PEG ^{CHEM}	146
5.7.2	ADSORPTIONSVERHALTEN VON EPITOP-TBP-PEG.....	146
5.7.3	ADSORPTIONSVERHALTEN DER PEPTID-PEG-KONJUGATE S1-PEG BIS S6-PEG.....	147
5.7.4	EXPERIMENTE ZUR ENZYMATISCHEN AKTIVIERUNG VON S4-PEG	149
5.7.4.1	Adsorptionsverhalten des enzymatisch aktivierten S4-PEG	149
5.7.4.2	Referenzexperiment: nicht-aktiviertes S4-PEG ohne TEV Protease	149
5.7.4.3	Referenzexperiment: G-TBP-PEG^{CHEM} ohne TEV Protease	150
5.7.4.4	Referenzexperiment: Suppressionsdomäne IF4^{CHEM} ohne TEV Protease.....	151
5.7.4.5	Referenzexperiment: artifizielle Referenz REF1^{CHEM} [78 %] ohne TEV Protease	152
5.7.4.6	Referenzexperiment: Protease-Puffer ohne TEV Protease	152
5.7.5	ENZYMABHÄNGIGES ADSORPTIONSVERHALTEN VON G-TBP-PEG ^{CHEM} [100 %]	153
5.7.6	ADSORPTIONSVERHALTEN DES LINEAREN DIMERES (G-TBP) ₂ -PEG ^{CHEM} UND DES VERZWEIGTEN DIMERES (G-TBP) ₂ K-PEG ^{CHEM}	155
5.7.7	ADSORPTIONSVERHALTEN DER SCHWACH-BINDENDEN DIMERE (S4) ₂ K-PEG UND (S7) ₂ K-PEG.....	155

5.7.8	KONZENTRATIONSABHÄNGIGES ADSORPTIONSVERHALTEN DES VERZWEIGTEN DIMERES (G-TBP) ₂ K-PEG ^{CHEM}	156
5.7.9	EXPERIMENTE ZUR ENZYMATISCHEN AKTIVIERUNG VON (S7) ₂ K-PEG	158
5.7.9.1	Adsorptionsverhalten des enzymatisch aktivierten (S7) ₂ K-PEG	158
5.7.9.2	Referenzexperiment: nicht-aktiviertes (S7) ₂ K-PEG ohne TEV Protease	159
5.7.9.3	Referenzexperiment: (G-TBP) ₂ K-PEG ^{CHEM} ohne TEV Protease	160
5.7.9.4	Referenzexperiment: Suppressionsdomäne IF7 ^{CHEM} ohne TEV Protease	160
5.7.9.5	Referenzexperiment: artifizielle Referenz REF2 ^{CHEM} [79 %] ohne TEV Protease	161
5.7.10	REFERENZEXPERIMENTE DER TEV PROTEASE	162
5.7.10.1	Referenzexperiment: Adsorptionsverhalten der TEV Protease zur Aktivierung von S4-PEG	162
5.7.10.2	Referenzexperiment: Adsorptionsverhalten der TEV Protease zur Aktivierung von (S7) ₂ K-PEG	163
5.7.11	ANTIFOULING-EIGENSCHAFTEN DER BIOKONJUGAT-BESCHICHTUNGEN	164
5.7.11.1	Stabilität der Beschichtungen der synthetischen Analoga G-TBP-PEG ^{CHEM} und (G-TBP) ₂ K-PEG ^{CHEM} gegenüber der Adsorption von BSA	164
5.7.11.2	Stabilität der Beschichtung des enzymatisch aktivierten (S7) ₂ K-PEG ^{CHEM} gegenüber der Adsorption von BSA	166
5.7.11.3	Referenzexperiment: Rinderserumalbumin (BSA) auf unbeschichtetem TiO ₂	166
5.7.12	ADSORPTIONSVERHALTEN AUF SILICIUMDIOXID-OBERFLÄCHEN	167
5.7.12.1	Adsorptionsverhalten von G-TBP-PEG ^{CHEM}	167
5.7.12.2	Adsorptionsverhalten von S4-PEG	168
5.8	Peptidfunktionalisierte Biosensor-Systeme	169
5.8.1	MALEINIMID-FUNKTIONALISIERTE PEG-HYDROGELPARTIKEL	169
5.8.2	IMMOBILISIERUNG VON CYSTEIN-PEPTIDEN	170
5.8.2.1	Quantitative Analyse der Oxidation des Cystein-Peptides PEP ^{RhB}	170
5.8.2.2	Bestimmung des Peptid-Funktionalisierungsgrades	171
5.8.3	ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG PEPTIDFUNKTIONALISierter PEG-SCPs	174
5.8.4	RICM-MESSUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER ADHÄSIONSENERGIEN	175
6	LITERATURVERZEICHNIS	177
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	201
	PUBLIKATIONSLISTE	I
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	III

MOTIVATION UND ZIELSTELLUNG

Bereits vor mehr als 100 Jahren wurde mit der industriellen Produktion von Bakelit der Grundstein für synthetische Polymere als unentbehrlicher Werkstoff gelegt.^[1] Heutzutage sind die makromolekularen Verbindungen ein fester Bestandteil in nahezu allen Bereichen des täglichen Lebens.^[2] Ungeachtet dessen verlangt der technologische Fortschritt der modernen Gesellschaft eine stetige Weiterentwicklung polymerbasierter Produkte. Insbesondere die Schaltbarkeit von Materialeigenschaften durch einen externen Stimulus rückt dabei immer mehr in den Fokus der wissenschaftlichen und industriellen Forschung. So wurden beispielsweise lichtresponsive Poly(acrylat)e als strahlungshärtende Klebstoffe für die Medizintechnik oder thermotrope Polymere als Dämmstoffe für die Bauindustrie entwickelt.^[3] Dennoch sind die Anwendungsmöglichkeiten der polydispersen Verbindungen aufgrund mangelnder Sequenzkontrolle während des Herstellungsprozesses begrenzt.^[4] Limitierungen hinsichtlich der Spezifität der Wechselwirkungen mit anderen Molekülen oder Systemen sowie der Ausbildung komplexer Struktur motive beschränken das funktionale Spektrum synthetischer Polymere. Im Vergleich dazu verfügen biomakromolekulare Strukturen wie Peptide über ein breiter gefächertes Leistungsvermögen, sich veränderten Bedingungen anzupassen. In natürlicher Umgebung reagieren die monodispersen Verbindungen auf die verschiedensten Einflüsse wie beispielsweise die Einwirkung von Licht, Änderungen des pH-Wertes oder der Temperatur.^[5-7] Durch diese und andere Stimuli können strukturelle Veränderungen hervorgerufen oder spezifische Funktionen aktiviert bzw. deaktiviert werden. Dementsprechend sind Forschungseinrichtungen bestrebt, stimuli responsive Peptide in medizinische und materialwissenschaftliche Konzepte aufzunehmen.^[8] Vor diesem Hintergrund konnte durch die Integration von Peptiden in synthetische Polymere eine neue Klasse bioinspirierter Hybridmakromoleküle entwickelt werden. Die Verknüpfung zu Peptid-Polymer-Konjugaten – auch als Biokonjugate bezeichnet – ermöglicht es, die strukturellen und funktionalen Eigenschaften stimuli responsiver Peptid-domänen in die verschiedensten Anwendungen einzubeziehen.^[9, 10]

Hinsichtlich Spezifität und Vielfältigkeit materialwissenschaftlich relevanter Stimuli nehmen Enzyme einen besonderen Stellenwert ein.^[11-13] Durch die katalytischen Wirkmechanismen der verschiedenen Enzymklassen können Aktivierungsprozesse gezielt induziert und Struktur und Funktion polymergebundener Peptide präzise programmiert werden.^[14] Unter anderem sind enzym responsive Biokonjugate in Form mizellarer Aggregate als Transportsysteme für medizinische Therapien^[15] geeignet oder können als biomimetische Hydrogele für die Züchtung und

Regenerierung von Geweben^[16-19] verwendet werden. Ferner ermöglichen Biotransformationen, Struktur und Morphologie von Hybridmakromolekülen zu kontrollieren.^[20-22] Darüber hinaus können mittels enzymatisch aktivierbarer Adhäsionsdomänen gebunden an bioinerte Polymere sogenannte Antifouling-Beschichtungen erzeugt werden, um unerwünschte Ablagerungen von Proteinen und Bakterien auf Oberflächen zu unterbinden.^[23, 24]

Von aktueller Relevanz ist das gezielte Maskieren der nativen Funktionen modulierbarer Biokonjugate durch enzymatisch abtrennbare Modifikationen, um so deren Eigenschaften bei Bedarf aktivieren zu können (vgl. **Abbildung 1.1**).^[20-22, 25-27] Insbesondere die bindungsspaltenden Wirkmechanismen proteolytischer Enzyme erlauben eine präzise Programmierung gewünschter Funktionen.^[25-27] In der vorliegenden Arbeit soll die Leistungsfähigkeit des Konzeptes am Beispiel einer enzymatisch aktivierbaren Adhäsionsdomäne evaluiert werden. Dafür wird zunächst die Oberflächenhaftung einer literaturbekannten Adhäsionsdomäne durch die Modifikation mit einer Suppressionsdomäne unterdrückt. Zwischen den beiden Peptidsegmenten wird eine spezifische Erkennungssequenz als enzymresponsive Einheit eingeführt, um die haftungsunterbindende Einheit abtrennen zu können. Durch Verknüpfung des nicht-bindenden Vorläufers mit dem bioinerten Poly(ethylenglycol) [PEG] wird ein enzymatisch aktivierbares Biokonjugat erhalten. Die Prozessierung mittels einer spezifischen Protease soll die adhäsiven Eigenschaften des Peptid-Polymer-Konjugates aktivieren und die Beschichtung von Metalloxid-Oberflächen für potentielle Antifouling-Anwendungen ermöglichen.

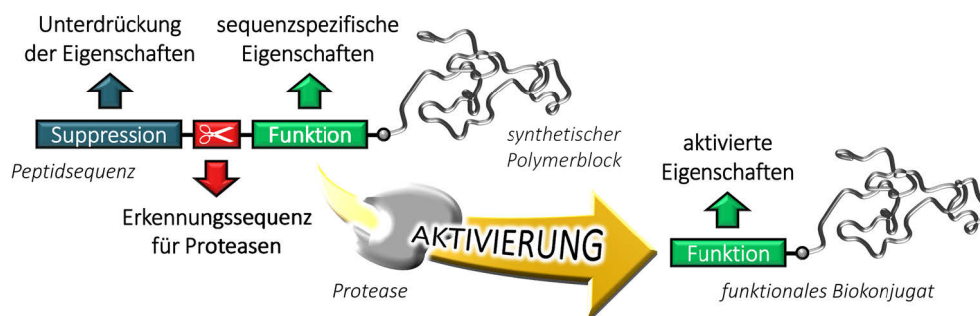


Abbildung 1.1. Konzept enzymatisch aktivierbarer Peptid-Polymer-Konjugate für medizinische und materialwissenschaftliche Anwendungen.^[25-27] Die funktionalen Eigenschaften einer polymergebunden Peptiddomäne sollen durch die Modifikation mit einer Suppressionsdomäne unterdrückt werden. Eine proteasespezifische Erkennungssequenz zwischen den beiden Segmenten soll die Abtrennung der funktionsunterbindenden Einheit ermöglichen. Die Prozessierung mittels einer spezifischen Protease soll die funktionalen Eigenschaften des Peptid-Polymer-Konjugates aktivieren.

Ausgehend von dem vorgestellten konzeptionellen Ansatz werden exploratorische Arbeiten angestrebt, mit Hilfe von PEG-basierten Hydrogelpartikeln die spezifischen Wechselwirkungen enzymatisch aktivierbarer Adhäsionsdomänen quantitativ zu analysieren. Dafür werden entsprechend nicht-bindende Peptid-Vorläufer an elastische Hydrogelsonden immobilisiert und mittels einer spezifischen Protease prozessiert. Die mit der Ausbildung multivalenter Oberflächenkontakte einhergehende mechanische Verformung der Affinitätsbiosensor-Systeme soll reflexionskontrastmikroskopisch ausgelesen und die Bestimmung der Oberflächenenergien adhäsiver Peptiddomänen ermöglichen.

Kapitel 2

STAND DER FORSCHUNG

2.1 Die Integration stimuliresponsiver Peptide in synthetische Polymere

Die Responsivität biomakromolekularer Strukturen gegenüber umgebungsbedingten Einflüssen ist in lebenden Systemen und Organismen von zentraler Bedeutung.^[28] Über einen Zeitraum von rund vier Milliarden Jahren Evolution und Selektion^[29-31] entwickelte die Natur eine Reihe komplexer Mechanismen, lebenswichtige Prozesse mittels verschiedener äußerer und innerer Stimuli gezielt zu regulieren.^[32] Dabei reagieren die Systeme unter anderem auf Variationen hinsichtlich der Temperatur, des pH-Wertes, der Ionenkonzentration sowie die Einwirkung von Licht oder die Präsenz bzw. Abwesenheit regulierend wirkender Biomoleküle durch strukturelle Veränderungen. Diese können sowohl auf molekularer als auch auf makroskopischer Ebene induziert und in definierte Funktionen übersetzt werden.^[33, 34]

Die responsiven Mechanismen natürlicher Systeme in materialwissenschaftliche Konzepte und Anwendungen einzubinden hat in den vergangenen Jahrzehnten für Forschung und Industrie an Bedeutung gewonnen.^[8] Insbesondere Biopolymere wie Peptide und Proteine können durch einen definierten Stimulus prozessiert und deren Eigenschaften präzise programmiert werden.^[6, 7, 35-37] Die enge Verknüpfung von Struktur und Funktion wird in den makromolekularen Verbindungen durch einen minimalen Satz kleinerer Biomoleküle codiert: In lebenden Systemen werden die proteinogenen Aminosäuren in vielfältigen Anordnungen über Amidbindungen zu definierten Polypeptidketten unterschiedlicher Länge biosynthetisch exprimiert.^[38] Durch komplexe Faltungs- und Selbstorganisationsprozesse können die monodispersen Primärsequenzen anschließend zu dreidimensionalen Architekturen assoziiert werden (vgl. **Abbildung 2.1 links**).^[39, 40] Die Ausbildung hierarchischer Struktur motive befähigt Peptide und Proteine, zahlreiche fundamentale Funktionen in Zellen und Organismen zu übernehmen. Beispielsweise sind diese Biopolymere als antimikrobielle Peptide an der Immunabwehr beteiligt,^[41] als Rezeptoren für die Zellkommunikation verantwortlich^[42] oder verfügen als Enzyme über katalytische Aktivität.^[14] Bei letzteren handelt es sich um hocheffiziente Proteine, welche eine Vielzahl biochemischer Prozesse auf molekularer Ebene regulieren. Durch die einfache Umwandlung funktioneller Gruppen oder die Spaltung chemischer Bindungen bis hin zur Neuverknüpfung können die strukturellen und funktionalen Eigenschaften eines Systems gezielt gesteuert werden.^[14] Die Effizienz und Präzision hinsichtlich der Biotransformation von Biomolekülen prädestinieren Enzyme als substratspezifisch agierende Stimuli für medizinische

und materialwissenschaftliche Konzepte.^[11, 12, 43] Der entscheidende Vorteil einer Prozessierung durch Enzyme natürlicher Herkunft liegt in der Möglichkeit einer *in situ* Anwendung. In der vorliegenden Arbeit soll das Potential der katalytisch wirksamen Proteine zur Aktivierung peptidbasierter Adhäsionsdomänen näher beleuchtet werden.

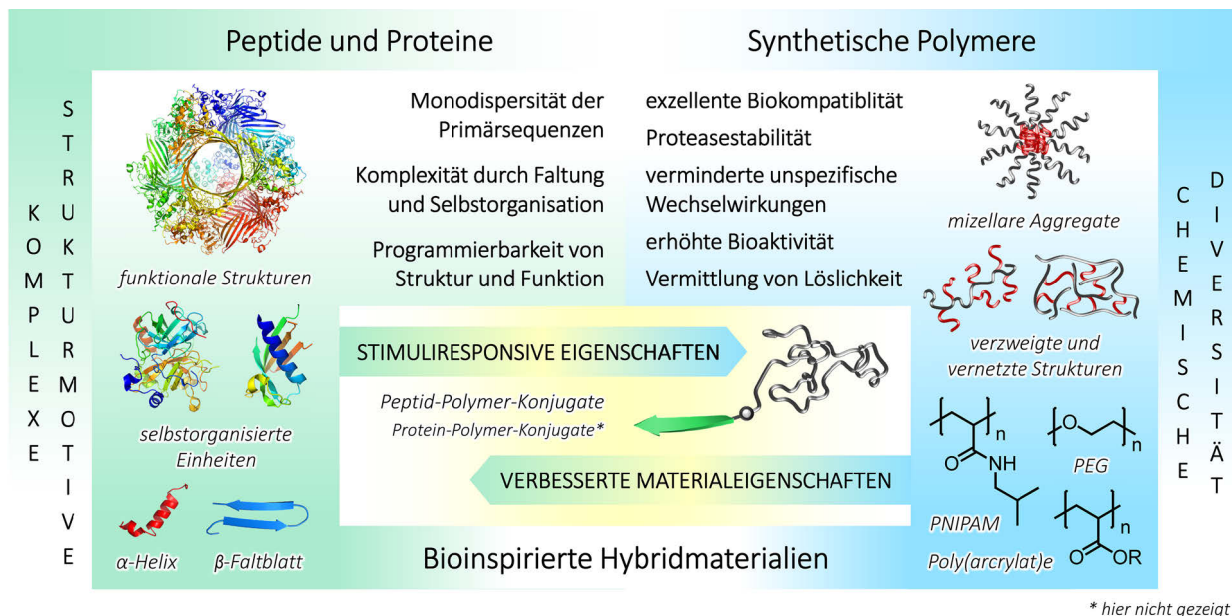


Abbildung 2.1. Gegenüberstellung der komplexen und funktionalen Struktur motive stimuli responsiver Peptide und Proteine (**links**) im Vergleich zu der chemischen Diversität synthetischer Polymere (**rechts**). Die Integration der Biomakromoleküle in nicht natürliche Systeme führt zu einer neuen Klasse bioinspirierter Hybridmaterialien in Form von Peptid- und Protein-Polymer-Konjugaten mit verbesserten Materialeigenschaften und stimuli responsiven Merkmalen (**mittig**). Proteinstrukturen PDB ID (engl. *Protein Data Bank identification code*): 1CQ0,^[44] 2MZ6,^[45] 3DA9,^[46] 1KW1^[47] und 2YGD.^[48]

Ungeachtet der vielfältigen Möglichkeiten, die strukturellen und funktionalen Eigenschaften von Peptiden und Proteinen durch verschiedene Stimuli schalten zu können, unterliegen die Biomakromoleküle vor allem in Bezug auf biologische und pharmazeutische Anwendungen gewissen Einschränkungen. Potentielle Toxizität,^[49] Immunogenität^[50] oder der Verlust der biologischen Aktivität durch umgebungsbedingte Veränderungen^[51, 52] erfordern präventive Maßnahmen, um die natürlichen Verbindungen ohne Vorbehalt nutzen zu können. Die beschriebenen Anwendungslimitierungen können durch die Integration der stimuliresponsiven Peptide und Proteine in synthetische Polymere überwunden werden. Die resultierenden Peptid- bzw. Protein-Polymer-Konjugate bilden eine bemerkenswerte Klasse bioinspirierter Hybridmaterialien (vgl. **Abbildung 2.1 mittig**).^[53, 54] Durch die Verknüpfung mit synthetischen Polymeren können funktionale Biokonjugate erhalten werden, deren Qualitäten als verwertungsfähige Materialien denen der nativen Biomakromoleküle überlegen sind.^[55, 56] Vor allem hinsichtlich entscheidender Kriterien wie der Biokompatibilität, Stabilität und Aktivität sowie des Löslichkeitsverhaltens wird die Leistungsfähigkeit der Peptid- und Proteinstrukturen infolge der Polymeranbindung entscheidend verbessert. (vgl. **Abbildung 2.1 rechts**).^[10, 51, 57, 58] Obendrein können durch die synthetische Komponente neue makroskopische Eigenschaften in Form verzweigter und vernetzter Struktur motive eingebracht oder beispielsweise die Bildung

mizellarer Aggregate vermittelt werden.^[59] Neben Polymeren wie Poly(*N*-isopropylacrylamid)en [PNIPAM]^[60] oder Poly(acrylat)en^[61] werden bevorzugt wasserlösliche Poly(ethylen-glycol)e [PEG]^[62] in die bioinspirierten Hybridmakromoleküle eingebunden.^[63] Die PEGylierung (engl. *PEGylation*) von Peptiden und Proteinen verlängert die Verweildauer im Blutkreislauf und erhöht die Stabilität gegenüber dem Abbau durch Enzyme (engl. *stealth effect*).^[64, 65] Darüber hinaus können durch Beschichtungen basierend auf dem bioinerten Polymer unerwünschte Ablagerungen von Proteinen und Bakterien auf Oberflächen unterbunden werden.^[66] Bevor jedoch auf die Bedeutung PEGylierter Adhäsionsdomänen als Antifouling-Beschichtungen näher eingegangen wird, werden in den nachstehenden Kapiteln zunächst etablierte Strategien zur Darstellung stimuliresponsiver Peptid-Polymer-Konjugate dargelegt, gefolgt von einem Überblick zu den Wirkmechanismen materialwissenschaftlich relevanter Stimuli.

2.2 Strategien zur Darstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten

2.2.1 KONVERGENTE UND DIVERGENTE SYNTHESESTRATEGIEN IM ÜBERBLICK

Um die stimuliresponsiven Eigenschaften von Peptiden mit den exzellenten Materialqualitäten synthetischer Polymere vereinen zu können, wurde eine Reihe verschiedener Synthesestrategien zur Darstellung definierter Biokonjugat-Strukturen entwickelt.^[37, 67-70] Die am häufigsten verwendete und effizienteste Methode beruht auf einem konvergenten Ansatz und wird als „*grafting to*“ bezeichnet.^[55, 71] Dabei erfolgt eine direkte Verknüpfung zwischen Polymereinheit und Peptidsequenz auf Basis einer komplementären Reaktivität der funktionellen Gruppen (vgl. **Abbildung 2.2 links**). Die Methode erlaubt eine unabhängige Synthese der beiden Komponenten, so dass hochreine und präzise analysierte Strukturen miteinander verbunden werden können. Für eine erfolgreiche Konjugation von Polymer und Biomakromolekül muss die Reaktivität der funktionellen Gruppen der zu verknüpfenden Verbindungen eindeutig definiert sein. Dadurch kann die Bildung unerwünschter Nebenprodukte umgangen und ein möglichst vollständiger Umsatz erzielt werden.^[4]

Divergente Strategien bieten durch das Einbeziehen kontrolliert radikalischer Polymerisationstechniken weitere Möglichkeiten, synthetische Polymere mit funktionalen Peptiden zu verbinden.^[59, 72] ATRP^[73] (engl. *atom transfer radical polymerization*), RAFT^[74] (engl. *reversible addition-fragmentation chain transfer*) oder NMP^[75] (engl. *nitroxide-mediated polymerization*) sind mit wässrigen Bedingungen kompatibel und tolerieren die vielfältigen funktionellen Gruppen der Aminosäure-Seitenketten der biologischen Verbindungen, so dass störende Nebenreaktionen vermieden werden.^[4] Vor diesem Hintergrund können die Peptid-Polymer-Konjugate auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert werden. Die Strategie „*grafting from*“ beruht auf dem sukzessiven Aufbau des Polymers ausgehend von einer vorgefertigten Peptidsequenz (vgl. **Abbildung 2.2 mittig**).^[76-78] Diese fungiert als Makroinitiator und wird nach der Modifikation mit einer reaktiven Einheit entsprechend der gewählten Polymerisationstechnik kontrolliert radikalisch zu einem linearen Biokonjugat polymerisiert. Durch den ebenfalls divergenten Syntheseansatz „*grafting through*“ wird die Peptidsequenz zunächst mit einer geeigneten monomeren Einheit verknüpft. Anschließend können die monomergebundenen Peptide polymeri-

siert werden können (vgl. **Abbildung 2.2 rechts**). Die resultierenden Peptid-Polymer-Konjugate weisen in der Regel kammartige Strukturen auf, wobei das Polymerrückgrat die entsprechende Peptidsequenz als Seitenketten trägt.^[71]

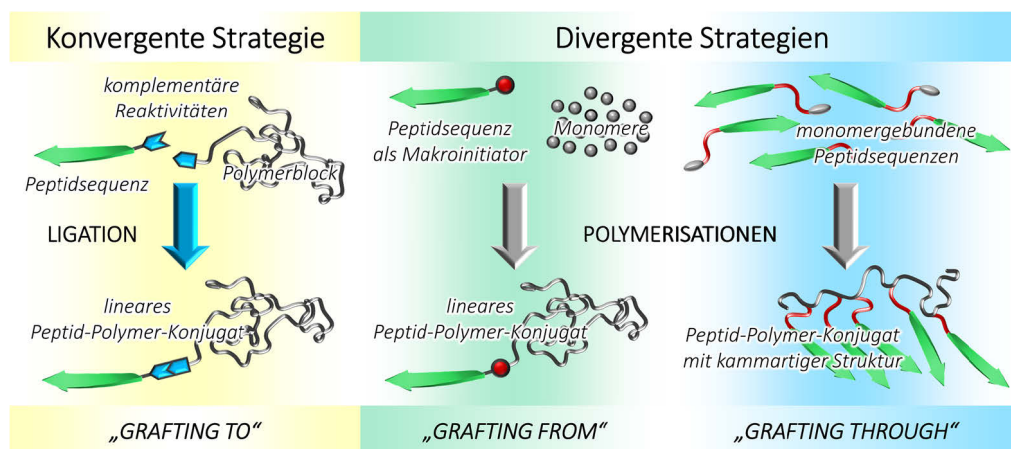


Abbildung 2.2. Etablierte Synthesestrategien zur Darstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten. Die konvergente Strategie „grafting to“ ermöglicht eine direkte Verknüpfung von Biomakromolekül und Polymer basierend auf deren komplementärer Reaktivität (**links**).^[55, 71] Divergente Strategien: Die Methode „grafting from“ beruht auf der kontrolliert radikalischen Polymerisation ausgehend von einem Peptid-Makroinitiator (**mittig**).^[76-78] Für den Ansatz „grafting through“ wird eine Peptidsequenz mit einer monomeren Einheit verknüpft, welche anschließend polymerisiert werden kann (**rechts**).^[4, 71]

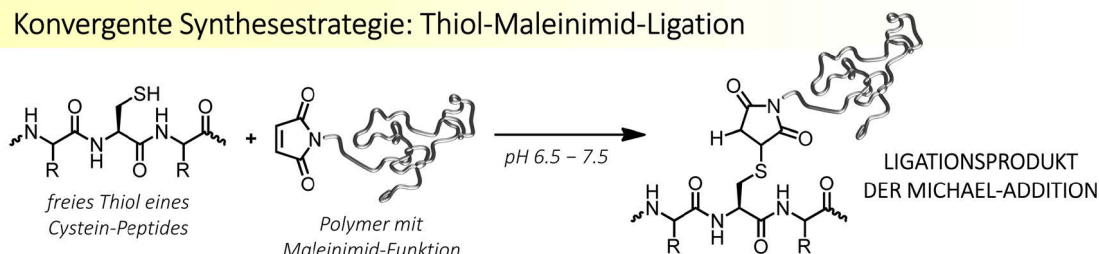
Im Vergleich zu der Strategie „grafting to“ können bei der Methode „grafting through“ die Bildung unliebsamer Reaktionsprodukte und geringe Produktausbeuten umgangen werden. Die Monomere werden vor der Polymerisation mit der biomolekularen Strukturen verknüpft, so dass potentiell notwendige Reinigungsschritte leichter umzusetzen sind.^[4] Allerdings erfordert der Ansatz in Abhängigkeit der peptidgebundenen Monomereinheit eine erneute Optimierung der Reaktionsbedingungen, wobei die mittlere Länge des Peptid-Polymer-Konjugates nicht exakt reproduziert werden kann. Darüber hinaus ist die Methode weniger variabel als die konvergente Synthesestrategie, durch welche theoretisch jede Peptidsequenz mit einer geeigneten reaktiven Einheit an ein beliebiges synthetisches Polymer konjugiert werden kann. Eine für die vorliegende Arbeit relevante Strategie zur Darstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten ist die sogenannte Thiol-Maleinimid-Ligation.

2.2.2 THIOL-MALEINIMID-LIGATION

Basierend auf der Strategie „grafting to“ bietet die kovalente Verknüpfung der freien Thiole von Cystein-Seitenketten mit elektronendefizienten Doppelbindungen eine synthetisch einfache Methode, Biokonjugate zu erhalten. Im Gegensatz zu primären Aminen sind Thiole bzw. die proteinogene Aminosäure Cystein weniger häufig in natürlichen Peptidsequenzen vertreten. So kann eine mehrfache Konjugation der synthetischen Polymereinheit an ein Peptid vermieden und der damit oftmals verbundene Verlust an Aktivität und Funktionalität der Biokomponente umgangen werden.^[79] Eine gängige Darstellungsvariante beruht auf der definierten Reaktion von Maleinimid-modifizierten Polymeren, wobei die MICHAEL-Addition der Sulfhydrylgruppe

an die aktivierte Doppelbindung des Maleinimides zu einem Peptid-Polymer-Konjugat mit einer stabilen Thioetherbindung führt (vgl. **Schema 2.1**).^[80] Die natürliche Funktionalität des Thiols ermöglicht eine selektive Ligrationsreaktion zwischen Peptidsequenz und Polymer-einheit, ohne dass eine zusätzliche Modifikation des Biomakromoleküls erforderlich ist.

Konvergente Synthesestrategie: Thiol-Maleinimid-Ligation



Schema 2.1. Thiol-Maleinimid-Ligation als konvergente Synthesestrategie zur Darstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten: Die Reaktion zwischen dem freien Thiol eines Cystein-Peptides und der Maleinimid-Funktion eines entsprechend modifizierten Polymeres führt in einer MICHAEL-Addition zu einem Biokonjugat mit einer stabilen Thioetherbindung.^[80]

Die orthogonale Reaktivität zwischen freien Sulfhydrylgruppen und Maleinimiden kann unter wässrigen Bedingungen in einem pH-Bereich von 6.5 – 7.5 gewährleistet werden.^[81] Oberhalb dieses pH-Bereiches können unerwünschte Nebenreaktionen wie die Addition nukleophiler primärer Amine der Peptidsequenzen sowie die hydrolytische Ringöffnung des Maleinimides auftreten, wobei das entstehende Maleinsäure-Derivat nicht mehr durch ein Nukleophil adressiert werden kann.^[81] Wurde das gewünschte Thiol-Maleinimid-Produkt dagegen bereits gebildet, kann die Ringöffnung eine Stabilisierung des Biokonjugates bewirken, wodurch mögliche Austauschreaktionen durch andere Thiol-Verbindungen unterbunden werden.^[82] In Abhängigkeit des sterischen Anspruchs des Peptides oder Polymeres kann sich eine verminderte Zugänglichkeit der Funktionalitäten jedoch nachteilig auf Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Ligrationsreaktion ausüben. In Lösung können nicht abreagierte Edukte im Nachhinein nur schwer abgetrennt werden, weshalb effizientere Techniken zur Darstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten wie beispielsweise die SPAAC (engl. *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*)^[83] oder die STAUDINGER-Ligation^[84] zu bevorzugen wären.^[85] Wird die Maleinimid-Funktionalität dagegen an festen Phasen wie beispielsweise Partikeln oder Oberflächen immobilisiert, können nicht umgesetzte Thiol-Verbindungen problemlos durch geeignete Waschschrte entfernt und Produkte mit einem definierten Funktionalisierungsgrad erhalten werden.^[86] Eine weitere und überaus elegante Methode, um stimuliresponsive Peptidsequenzen mit synthetischen Polymeren zu verbinden, stellt die inverse Biokonjugation dar.

2.2.3 DIE INVERSE KONJUGATIONSSTRATEGIE

Die inverse Konjugationsstrategie bedient sich eines festen Trägermaterials, welches mit einer polymeren Einheit vorbeladen ist und von dieser ausgehend die biomakromolekulare Struktur sukzessive am Polymerträger aufgebaut werden kann. Der Arbeitskreis MUTTER zeigte dies erstmalig durch die Verknüpfung von Poly(ethylenglycol) mit einem Polystyrolharz über einen Benzylether-Linker.^[87] Dieses grundlegende Konzept wurde von BAYER und RAPP zu einem

kommerziell verfügbaren Polymer-beladenen Harz weiterentwickelt – dem sogenannten PAP-Harz^[88-90] (engl. *PEG attached peptide resin*) – welches in der automatisierten festphasengebundenen Peptidsynthese^[91] (SPPS, engl. *solid-phase peptide synthesis*) verwendet werden kann.

Die beschriebenen Strategien bieten eine Vielzahl an Möglichkeiten, stimuliresponsive Peptide mit synthetischen Polymeren zu verknüpfen. Dabei können sowohl die Aminosäure-Seitenketten der Peptidsequenz adressiert als auch gezielt Funktionalitäten in das Biomakromolekül eingeführt werden, um selektive Ligationsreaktionen zu forcieren und hochreine Produkte zu erhalten. Im Hinblick auf eine gezielte Aktivierung der Strukturen oder Funktionen modulierbarer Biokonjugate wird das Potential materialwissenschaftlich relevanter Stimuli für eine erfolgreiche Prozessierung – insbesondere durch Enzyme – in den nächsten Kapiteln dargelegt.

2.3 Klassifizierung und Wirkmechanismen materialwissenschaftlich relevanter Stimuli

Stimuliresponsive Biokonjugate offerieren ein breitgefächertes Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten für die materialwissenschaftliche und pharmazeutische Industrie.^[53, 92] Allgemein können die strukturellen und funktionalen Eigenschaften eines Hybridmakromoleküls auf molekularer Ebene durch physikalische, chemische oder biologische Stimuli beeinflusst werden (vgl. **Tabelle 2.1**).^[5] Dabei wirken sich bereits kleinste Veränderungen hinsichtlich der Umgebungsbedingungen maßgeblich auf die makroskopischen Merkmale des Systems aus.

Tabelle 2.1. Materialwissenschaftlich relevante Stimuli im Überblick. Eine allgemeine Klassifizierung erfolgt entsprechend der Beeinflussung der Materialeigenschaften auf physikalischer, chemischer oder biologischer Ebene.^[5]

physikalische Stimuli	chemische Stimuli
Temperatur ^[93-95]	pH-Wert ^[96-98]
elektromagnetische Strahlung ^[99-101]	redoxaktive Reagenzien ^[102-104]
Ionenstärke ^[105, 106]	spezifische Ionen ^[107-110]
Lösungsmittel ^[111-113]	biologische Stimuli
magnetische ^[114, 115] und elektrische Felder	Glucose ^[116]
mechanische Deformierung	Antigene ^[117, 118]
Ultraschall ^[119, 120]	Enzyme ^[15-25]

Hinweis: Die angegebenen Literaturstellen beziehen sich auf eine Auswahl bedeutender Publikationen und aktueller Resultate auf dem Gebiet stimuliresponsiver Peptid-Polymer-Konjugate.

Neben Peptiden und Proteinen als Bestandteil bioinspirierter Hybridmaterialien können einige synthetische Polymere aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften ebenfalls auf umgebungsbedingte Einflüsse ansprechen.^[121, 122] Die Responsivität gegenüber Veränderungen der Temperatur beispielsweise kann ein Ausfallen des zuvor gelösten Polymers bzw. die Ausbildung von Gelen bewirken, die Adsorption auf Oberflächen vermitteln oder zum Kollabieren von Hydrogelen und immobilisierter Polymere führen.^[5, 123, 124] Die Reversibilität des Löslichkeitsverhaltens einer thermoresponsiven PNIPAM-Einheit in Abhängigkeit von der

kritischen Lösungstemperatur erlaubte es unter anderem, polymergebundene Enzyme durch Phasenseparation zu isolieren.^[93, 95]

Der Vorteil äußerer physikalischer Stimuli wie Variation der Temperatur, elektromagnetischer Strahlung oder das Anlegen eines magnetischen Feldes liegt darin, dass diese nicht der kinetisch limitierten Diffusion eines in das System eingebrachten Stimulus unterliegen.^[125] Die Prozessierung stimuliempfindlicher Biokonjugate durch beispielsweise Veränderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke erfordert das Hinzufügen entsprechender Ionen. Deren lokale Verfügbarkeit ist an die sterische Zugänglichkeit der zu regulierenden Komponente gebunden, weshalb durch derartige Stimuli initiierte Schaltprozesse vergleichsweise langsam ablaufen.^[33]

Gleichermaßen relevant für die Auswahl eines Stimulus ist der zugrunde liegende Wirkmechanismus auf molekularer Ebene, wodurch die makroskopischen Eigenschaften modulierbarer Biokonjugate definiert werden. Reversible Schaltprozesse können durch die Anpassung der Temperatur^[93-95] oder das Hinzufügen spezifischer Ionen^[107-110] induziert werden. Dies beeinflusst das Löslichkeitsverhalten der Peptid-Polymer-Konjugate und führt zu dynamischen Konformationsänderungen (vgl. **Abbildung 2.3**).^[126]

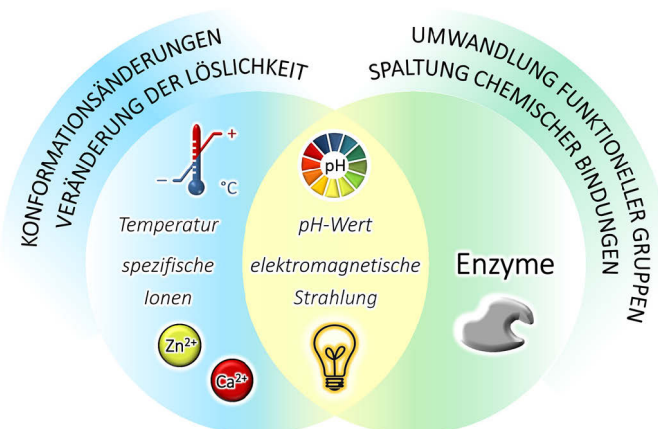


Abbildung 2.3. Unterteilung ausgewählter Stimuli zur Prozessierung responsiver Biokonjugate entsprechend des Wirkmechanismus^[126] auf molekularer Ebene. Durch die Variation der Temperatur oder die Zugabe von Ionen können dynamische Konformationsänderungen induziert und/oder die Löslichkeit der Systeme beeinflusst werden, wohingegen Enzyme funktionelle Gruppen ineinander überführen und chemische Bindungen spalten können. Stimuli wie Änderungen des pH-Wertes oder die Einwirkung elektromagnetischer Strahlung – beispielsweise auf einen zusätzlich in ein System integrierten lichtaktivierbaren Photoschalter – repräsentieren den Übergang zwischen reversiblen Schaltprozessen und der gezielten Aktivierung einer Funktion.

Stimuli wie die Variation des pH-Wertes^[97, 98] oder die Einwirkung elektromagnetischer Strahlung^[99-101] – beispielsweise auf einen zusätzlich integrierten lichtaktivierbaren Photoschalter – können neben dynamischen Prozessen auch nicht wiederherstellbare strukturelle Veränderungen induzieren. Letztere führen sowohl zur Umwandlung funktioneller Gruppen als auch zur Spaltung chemischer Bindungen. So verwendete der Arbeitskreis BÖRNER die pH-Abhängigkeit eines intramolekularen $O \rightarrow N$ -Acyltransfers^[127] zur Aktivierung der peptidgeleiteten Selbstorganisation.^[96, 97] Die gezielte Integration von Defektsegmenten in polymergebundene Peptidaggregationsdomänen ermöglichte baseninduzierte Umlagerungen und führte zur Rückbildung der nativen β -Faltblattstrukturen. Die Arbeitsgruppe MEZZENGA dagegen nutzte die

photochemische Isomerisierung von Spiropyranen^[128] zur reversiblen Desaggregation von mizellaren Poly(L-Glutaminsäure)-PEG-Konjugaten.^[101] Entsprechend der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes konnten die Mizellen entweder aufgelöst oder gebildet werden.

Neben den beschriebenen Einflüssen zur Prozessierung responsiver Biokonjugate können Enzyme die strukturellen und funktionalen Eigenschaften der Hybridmakromoleküle präzise aktivieren.^[13, 43, 129] Durch die Biotransformationen können funktionelle Gruppen ineinander überführt sowie chemische Bindungen gespalten oder Peptidfragmente neu verknüpft werden (vgl. **Abbildung 2.3**).^[14] In den biochemischen Prozessen lebender Systeme und Organismen beruht die katalytische Aktivität von Enzymen in der Regel auf reversiblen Mechanismen. Jedoch wird das chemische Gleichgewicht anwendungsrelevanter Enzymreaktionen aufgrund der gewählten Umgebungsbedingungen hinsichtlich Parameter wie pH-Wert, Druck oder Temperatur thermodynamisch vornehmlich in eine gewünschte Richtung forciert.^[13, 129] Obwohl reversible Schaltprozesse unter geeigneten Bedingungen enzymatisch induzierbar sind,^[130] konnte auf Basis enzymresponsiver Peptidsequenzen bisher noch kein vollständig dynamisches System entwickelt werden.^[13] Dennoch offerieren die biologischen Stimuli eine einzigartige Vielfalt an Möglichkeiten, die strukturellen und funktionalen Eigenschaften enzymatisch adressierbarer Peptid-Polymer-Konjugate zu regulieren.^[131, 132] Insbesondere die katalytischen Wirkmechanismen der verschiedenen Enzymklassen erlauben gezielte Biotransformationen der Biokonjugate für materialwissenschaftliche und biomedizinische Anwendungen.^[11-13]

2.4 Enzymresponsive Peptid-Polymer-Konjugate

Im Jahr 2006 prägte REIN V. ULIJN den Begriff der enzymresponsiven Materialien (ERMs, engl. *enzyme-responsive materials*).^[129] Diese beschrieb ULIJN als enzymesensitive Verbindungen, deren strukturellen Eigenschaften auf makroskopischer Ebene durch Veränderung der molekularen Wechselwirkungen beeinflusst werden, wie beispielsweise in Hydrogelen oder Nanopartikeln. Mittlerweile wurde diese Definition dahingehend erweitert, dass ERMs infolge der Stimulierung durch Enzyme Interaktionen mit anderen Systemen eingehen können, unter anderem mit Partikeln oder Oberflächen.^[43] Vor dem Hintergrund möglicher industrieller Anwendungen von Enzymen aus natürlichen Bezugsquellen gilt es zu berücksichtigen, dass diese das gesamte Potential ihrer katalytischen Aktivität vorwiegend nur unter milden Bedingungen – vergleichbar mit der Umgebung ihres biologischen Ursprungs – uneingeschränkt abrufen können.^[13] Durch die rekombinante Proteinexpression mittels gentechnisch veränderter Mikroorganismen können die Eigenschaften zahlreicher Enzyme hinsichtlich pH-Optimum, Temperaturstabilität oder Substratspezifität eingestellt werden.^[133] Darüber hinaus birgt die erhöhte Beständigkeit und die oftmals verlängerte katalytischen Aktivität gentechnisch modifizierter Enzyme einen weiteren positiven Aspekt: Verglichen mit anderen stimuliresponsiven Mechanismen verlaufen enzymatisch induzierte Aktivierungsprozesse relativ langsam.^[13] Folglich sind unempfindliche und langlebige Enzyme für bestimmte Anwendungen unabdingbar.^[13] Im Hinblick auf potentielle *in vivo* Applikationen bedienen sich Forschung und Entwicklung jedoch bevorzugt Enzymen bzw. enzymresponsiven Mechanismen, die unter physiologischen Bedingungen gleichermaßen effizient umgesetzt werden können.^[11-13] In **Tabelle 2.2** sind die Vorzüge von

Enzymen als Stimuli zur Prozessierung responsiver Biokonjugate den Anforderungen an ERM's bzw. deren anwendungsbedingten Einschränkungen gegenübergestellt.^[13]

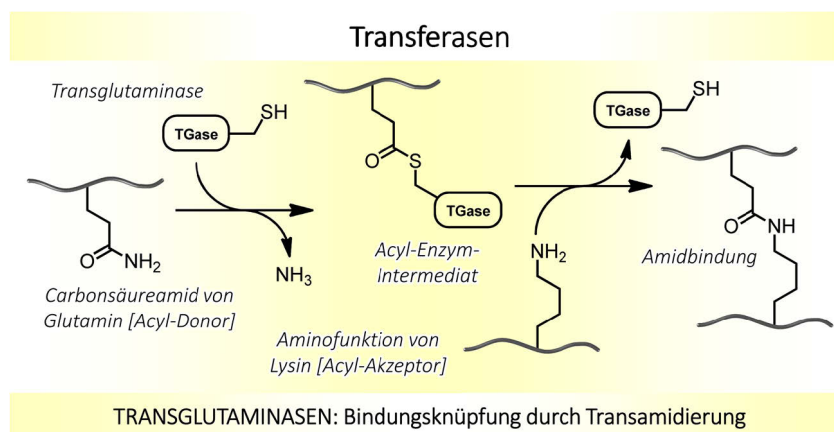
Tabelle 2.2. Vergleich der Vorzüge von Enzymen als Stimuli zur Prozessierung responsiver Peptid-Polymer-Konjugate mit den Anforderungen an ERM's bzw. deren anwendungsbedingten Einschränkungen.^[13]

Enzymen als Stimuli – Vorzüge	ERM's – Anforderungen und Einschränkungen
Natur als Bezugsquelle	Prozessierung relativ langsam
hochspezifische Wirkmechanismen	benötigen milde Bedingungen hinsichtlich
induzieren reversible und	pH-Wert, Druck, Temperatur <i>etc.</i>
irreversible Prozesse	biokompatible und bioinerte
hohe Vielfalt an enzymresponsiven	Polymereinheiten erforderlich
Einheiten adressierbar	enzymresponsive Einheiten müssen
viele Enzyme kommerziell verfügbar	zusätzlich integriert werden

Unabhängig von den genannten Limitierungen bewirken Enzyme eine gezielte Aktivierung der strukturellen und funktionalen Eigenschaften enzymesensitiver Biokonjugate. Hierfür kann auf eine hohe Vielfalt an verschiedenen Enzymklassen mit hochspezifischen Wirkmechanismen sowie entsprechend adressierbaren Peptid-Einheiten zurückgegriffen werden. So werden beispielsweise Erkennungssequenzen für hydrolytisch wirksame Enzyme wie Serinproteasen oder Matrix-Metalloproteasen (MMPs) in Peptid-Polymer-Konjugate eingebunden. Als Hydrogele^[11, 134, 135] oder polymergebundene Peptidtherapeutika (engl. *prodrugs*)^[26, 27, 136] ermöglichen ERM's unter anderem den Transport und die Freisetzung medizinischer Wirkstoffe. Weiterhin kann die molekülgruppenübertragende Aktivität von Transferasen zur Verknüpfung von Biokonjugaten mit Donor- und Akzeptor-Aminosäuren herangezogen werden und so den Aufbau gewebeartiger Strukturen (engl. *tissue engineering*) bewirken.^[116, 137] Ein innovativer Ansatz verbindet enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen mit bioinerten Polymeren, deren Biotransformation zu proteinresistenten Biokonjugat-Beschichtungen für anorganische Oberflächen führt.^[23, 24] Bevor jedoch das Potential entsprechender Hybridmakromoleküle zur Vermeidung unerwünschter Biomaterialablagerungen näher beleuchtet wird, werden zunächst die verschiedenen Wirkmechanismen materialwissenschaftlich relevanter Enzyme an Hand ausgewählter Forschungsergebnisse beschrieben.

2.4.1 ENTWICKLUNG UND BEDEUTUNG ENZYMRESPONSIVER BIOKONJUGATE

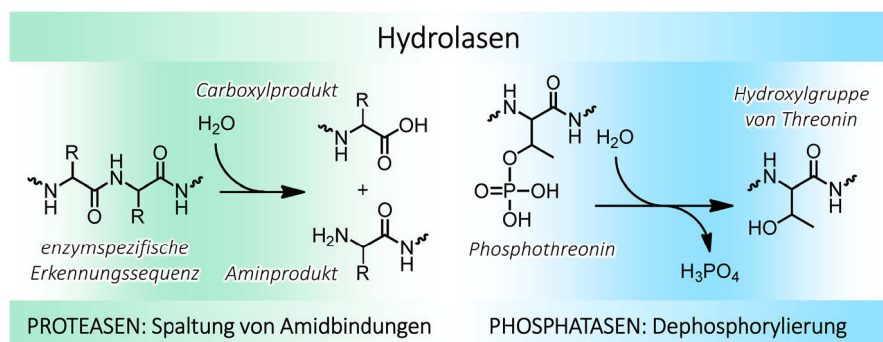
Enzyme wurden erst zum Ende des vergangenen Jahrhunderts zur gezielten Prozessierung von Peptid-Polymer-Konjugaten verwendet.^[13, 138, 139] 1997 involvierten SPERINDE und GRIFFITH den quervernetzenden Wirkmechanismus einer calciumabhängigen Transglutaminase,^[140] um die Peptidsequenzen eines Poly(L-Lysin-L-Phenylalanin) (Acyl-Akzeptor) mit PEGylierten Glutaminamiden (Acyl-Donor) zu verknüpfen (vgl. **Schema 2.2**).^[138] Die Transamidierung zwischen den beiden Komponenten bewirkte die Ausbildung neuer Amidbindungen.^[140] Anhand der entstandenen Hydrogele konnte ein erster wissenschaftlicher Ansatz präsentiert werden, den lokalen Aufbau hydratisierter Netzwerke durch eine Transferase *in situ* zu induzieren.



Schema 2.2. Die Enzymklasse der Transferasen zur Prozessierung enzymresponsiver Peptid-Polymer-Konjugate^[43]: Transglutaminasen katalysieren den Acyltransfer zwischen dem Carbonsäureamid eines Glutamins (Acyl-Donor) und der Aminofunktion eines Lysins (Acyl-Akzeptor) über ein Acyl-Enzym-Intermediat unter Bildung einer Amidbindung durch Transamidierung.^[140]

Auf Grundlage der Enzymklasse der Proteasen^[141] demonstrierten WEST und HUBBELL zwei Jahre später die Biotransformation quervernetzter Hydrogele.^[139] Dafür wurden zwei verschiedene, proteolytisch abbaubare Hybridnetzwerke durch die photochemische Polymerisation der Acrylat-terminierten Biokonjugate APG↓L-PEG-APG↓L bzw. VR↓N-PEG-R↓N synthetisiert. Deren gewebeartige Strukturen beruhten auf den Materialqualitäten der synthetischen Polymereinheit hinsichtlich Elastizität und Biokompatibilität und konnten die mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix (ECM, *engl.* extracellular matrix) imitieren.^[27] Die Prozessierung der Hydrogele jeweils mittels der Matrix-Metalloprotease MMP-1 – einer interstitiellen Collagenase^[142] – oder der Serinprotease Plasmin^[143] bewirkte die hydrolytische Spaltung der Amidbindungen (vgl. **Schema 2.3 links**) der enzymespezifischen Erkennungssequenzen APG↓L bzw. VR↓N.^[139] Die Resultate zeigten erstmalig den Abbau polymerbasierter Hydrogele durch Enzyme, die in multizellulären Organismen an der gerichteten Zellmigration beteiligt sind. Diese Modellsysteme konnten in verschiedenen Arbeiten zu biomimetischen Hydrogelen mit wundheilungsfördernden und regenerativen Eigenschaften weiterentwickelt werden.^[16-19] So beschrieb die Arbeitsgruppe WEST erst kürzlich das Potential eines enzymresponsiven Gerüstmaterials zur Unterstützung der Neubildung von feinen Blutgefäßen.^[19] Dazu wurden adhäsive Acrylat-RGDS-PEG-Konjugate mit proteasesensitiven Strukturen der Form Acrylat-PEG-GGGPQG↓IWGQGK-PEG-Acrylat in Gegenwart einer Kultur aus endothelialen Vorläuferzellen des menschlichen Nabelschnurblutes und muralen Zellen (glatte Muskelzellen und Fibroblasten) photochemisch zu dreidimensionalen Hydrogelnetzwerken polymerisiert. Als Bestandteil verschiedener Matrixproteine vermittelt die trimere Sequenz RGD die Adhäsion an extrazelluläre Oberflächenrezeptoren (Integrine) und ist für die Wundheilung und Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung.^[144] Die in die biomimetische Hydrogelmatrix eingebundenen RGD-Motive konnten mit den Oberflächenrezeptoren der Zellen interagieren, während eine in dem Zellmaterial präsente Collagenase die proteolytische Spaltung der Erkennungssequenzen GGGPQG↓IWGQGK bewirkte.^[19] Durch die simultan verlaufenden Prozesse der Zelladhäsion und des Abbau des Hydrogels wurde die Wanderung der Zellen

innerhalb der gewebeartigen Biokonjugat-Strukturen begünstigt. Die *in situ* Ausbildung enzymatisch prozessierbarer Hydrogele offerierte innovative Anwendungsmöglichkeiten für ERM in der regenerativen Medizin.^[19]



Schema 2.3. Die Enzymklasse der Hydrolasen zur Prozessierung enzymresponsiver Peptid-Polymer-Konjugate^[43]: Proteasen katalysieren die Hydrolyse der Amidbindung einer enzymspezifischen Erkennungssequenz unter Bildung eines Carboxyl- und Aminproduktes (**links**).^[141] Phosphatasen katalysieren die Dephosphorylierung des Phosphorsäureesters einer Phosphothreonin-Seitenkette unter Bildung der freien Hydroxylgruppe von Threonin (**rechts**).^[145]

Seit den ersten entscheidenden Resultaten ist das Interesse von Wissenschaft und Industrie, ERM in materialwissenschaftliche Konzepte und Anwendungen einzubeziehen, kontinuierlich gestiegen.^[13, 43] Einen diesbezüglich leistungsfähigen Ansatzpunkt bietet das gezielte Maskieren einer funktionalen Peptidomäne durch systematisch eingeführte Modifikationen sowohl an den Seitenketten der Aminosäuren als auch an den Termini der Peptidsequenzen. Diese können bei Bedarf durch hydrolytische Enzyme wie Proteasen oder auch Phosphatasen entfernt werden, um die nativen Strukturen bzw. Funktionen der biologischen Einheiten zu regenerieren. Eine entsprechende Herangehensweise präsentierte der Arbeitskreis BÖRNER im Zusammenhang mit der Ausbildung fibrillärer Nanostrukturen durch einen enzymatisch induzierten Dephosphorylierungsprozess.^[21, 22] Phosphothreonin-Reste eingebunden in ein Peptid-PEG-Konjugat dienten der gezielten Unterdrückung der peptidgeleiteten Selbstorganisation von Aminosäure-Wiederholungseinheiten bestehend aus Threonin und Valin. Erst die Hydrolyse der Phosphorsäureester-Gruppen der Phosphothreonin-Seitenketten (vgl. **Schema 2.3 rechts**) durch die saure Phosphatase^[145] ermöglichte die Rückbildung der nativen β -Faltblattstruktur. Die Aggregation der hydrophil-hydrophoben Peptidsequenzen der Biokonjugate (TV)₅-PEG bewirkte die Entstehung assoziierter Nanofasern.

Ein besonders anwendungsrelevantes Aktivierungskonzept involviert Proteasen, um funktionsunterdrückende Modifikationen aus entsprechend responsiven Biokonjugaten zu entfernen. Der Arbeitskreis HOFFMANN konnte erst vor kurzem eine Serie PEGylierter Prodrugs entwickeln, deren Prozessierung durch Serumproteasen die kontrollierte Freisetzung therapeutischer Peptide bewirkte.^[26, 27] Dabei wurde die antibakterielle Aktivität von Oncocin und Apidaecin – zwei antibakteriellen Peptiden (AMPs, engl. *antimicrobial peptides*) – durch gezielt eingeführte PEG-Blöcke temporär blockiert. Die prolinreichen AMPs verfügen über eine hohe therapeutische Bandbreite zur *in vivo* Behandlung systemischer Infektionen durch gram-negative Pathogene.^[146, 147] Durch die PEGylierung konnte die Verweildauer der therapeutischen Peptide im Blut verlängert und deren Immunogenität reduziert werden. Die Verknüpfung der

AMPs mit den synthetischen Polymereinheiten über die Erkennungssequenzen GAR↓ und G(A)R↓SG erlaubte die proteolytische Abspaltung des Poly(ethylenglycol)s durch trypsinähnliche Proteasen wie Plasmin oder Thrombin im menschlichen Blutserum.^[26, 27] Der beschriebene Biotransformationsprozess führte zu einer Reaktivierung der antibakteriellen Wirksamkeit von Oncocin und Apidaecin und verdeutlichte das Potential enzymresponsiver Biokonjugate als Träger therapeutischer Wirkstoffe zur regulierten Freisetzung am Wirkort.

Das temporäre Maskieren funktionaler und polymergebundener Peptiddomänen durch proteolytisch spaltbare Modifikationen kann ebenfalls zur Abschirmung adhäsiver Peptiddomänen genutzt werden. Die Arbeitsgruppe ULIJN bediente sich des Aktivierungskonzeptes im Zusammenhang mit der enzymatisch induzierten Proliferation menschlicher Osteoblastenzellen.^[25] An PEG-Monolagen gebundene Trimere RGD konnten mittels *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-modifizierter Alanin-Einheiten (Fmoc-A) blockiert werden. Die auf Glasoberflächen immobilisierten Hybridmakromoleküle der Form Fmoc-A↓ARGD-PEG führten inaktiven und bioinerten Beschichtungen. Diese konnten in *in vitro* Experimenten die Adhäsion und gerichtete Migration der Osteoblastenzellen lokal unterbinden.^[25] In Gegenwart des Enzyms Elastase^[148] wurden die Amidbindungen zwischen den beiden Aminosäuren Alanin durch hydrolytische Spaltung aufgebrochen. Die Serinprotease dient Säugetieren der Bekämpfung und dem hydrolytischen Abbau pathogener Keime als Teil der unspezifischen Immunantwort.^[148] Die durch die Endopeptidase induzierte Aktivierung der oberflächen gebundenen Rezeptorbindungsmotive RGD eröffnete neue Perspektiven hinsichtlich der Ausbildung von Biokonjugat-Beschichtungen mit antimikrobiellen und entzündungshemmenden Eigenschaften.^[25]

Die beschriebenen Forschungsergebnisse veranschaulichen das umfassende Potential der verschiedenen Enzymklassen, synthetische Modifikationen in Peptid-Polymer-Konjugaten bei Bedarf zu entfernen und die native Struktur bzw. Funktion einer Peptiddomäne zu aktivieren. Insbesondere die bindungsspaltenden Mechanismen der Proteasen in Kombination mit deren vielfältig adressierbaren Erkennungssequenzen erlauben es, den materialwissenschaftlichen Ansatz wie angestrebt umzusetzen.

2.4.2 SPEZIFISCHE PROTEASEN FÜR MEDIZINISCHE UND MATERIALWISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

Eine unumgängliche Anforderung an durch Proteasen induzierte Biotransformationen besteht in einer hohen Spezifität der Enzyme gegenüber den in Biokonjugate integrierten Erkennungssequenzen. Auf diese Weise kann der vollständige Erhalt der funktionalen Peptiddomäne sichergestellt und das prozessierte System wie gewünscht aktiviert werden. Ein Überblick zu ausgewählten proteolytischen Enzymen für materialwissenschaftliche und biomedizinische Anwendungen unter Angabe von Enzymklasse und EC-Nummer (engl. *enzyme commission*) sowie deren Hauptbezugsquellen und spezifischen Erkennungssequenzen kann **Tabelle 2.3** entnommen werden.^[149] Die gebräuchlichsten Proteasen entstammen der Enzymklasse der Serinproteasen, zu denen neben den bereits genannten trypsinähnlichen Proteasen Plasmin und Thrombin aus dem Blutserum unter anderem der Faktor Xa oder die Enteropeptidase gehören.^[150] Jedoch können bei der Inkubation eines Substrates mit diesen Serinproteasen

zunehmend unspezifische und meist störende Proteolyseprodukte auftreten.^[149] So wurden für Faktor Xa – abgesehen von einer ineffizienten Hydrolyse C-terminal der Aminosäuren Arginin oder Lysin – unerwünschte Spaltungen weiterer Amidbindungen beobachtet.^[151] Demgegenüber kann die Erkennungssequenz von Thrombin mit der aus sechs Aminosäuren bestehenden Abfolge LVPR↓GS relativ spezifisch durch die Protease adressiert werden.^[149] Dennoch führt die Behandlung rekombinanter Proteine mit Thrombin nicht selten zu unerwünschten Proteolyseprodukten.^[152] Darüber hinaus können kommerziell verfügbare Präparationen von Serinproteasen mit weiteren proteolytisch aktiven Enzymen verunreinigt sein und dadurch ebenso nicht beabsichtigte Substratspaltungen hervorrufen.^[153]

Tabelle 2.3. Überblick zu proteolytischen Enzymen für materialwissenschaftliche und biomedizinische Anwendungen unter Angabe der jeweiligen Enzymklasse und EC-Nummer (engl. *enzyme commission*) sowie der Hauptbezugsquellen und spezifischen Erkennungssequenzen.

Enzymklasse	EC-Nummer	Protease	Hauptbezugsquelle	Erkennungssequenzen ^a
Serinproteasen	EC 3.4.21.4	Trypsin	Rinderpankreas	R↓X oder K↓X
	EC 3.4.21.5	Thrombin	Rinderplasma	R↓X oder K↓X spezifisch: LVPR↓GS ^[149]
	EC 3.4.21.6	Faktor Xa	Rinderplasma	R↓X oder K↓X spezifisch: LVPR↓GS ^[149]
	EC 3.4.21.7	Plasmin	humanes Plasma	R↓X oder K↓X ^[143]
	EC 3.4.21.9	Enteropeptidase	Rinderdarm	DDDDK↓ ^[154] P1' ≠ P oder W
	EC 3.4.21.37	Elastase	Schweinepankreas	A↓X, G↓X oder V↓X ^[149]
Cysteinproteasen	EC 3.4.22.28	Rhinovirus 3C Protease	<i>E. coli</i>	LEVLFQ↓GP ^[150]
	EC 3.4.22.44	TEV Protease	<i>E. coli</i>	ENLYFQ↓G ^[155, 156] P1' variabel ^[157] , P2' ≠ P
Metalloproteasen	EC 3.4.24.7	MMP-1 [Collagenase 1] <i>Matrix-Metalloprotease</i>	<i>E. coli</i>	verschiedene u. a.: APG↓L ^[139]
	EC 3.4.24.27	Thermolysin	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	L↓X oder F↓X X = L, F, V, M, A, I ^[149]

^a Soweit in der entsprechenden Literatur nicht anders vermerkt, definiert X eine beliebige proteinogene Aminosäure.

Im Vergleich zu den beschriebenen Serinproteasen weisen einige proteolytische Enzyme viralen Ursprungs eine deutlich höhere Spezifität gegenüber den jeweiligen Erkennungssequenzen der Substrate auf.^[149-152] Im Zusammenhang mit der Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine wurde neben der Rhinovirus 3C Protease die TEV Protease (engl. *tobacco etch virus*) als ein hochspezifisches Enzym zur effizienten Entfernung von Affinitätstags identifiziert.^[150, 158] Komplexe Faltungs- und Selbstorganisationsprozesse assoziieren virale Proteasen zu chymotrypsinähnlichen Strukturen, wobei anstelle von Serin ein Cystein in die katalytische Triade des aktiven Zentrums involviert wird.^[150] Auch wenn die Erkennungssequenzen für zelluläre Serinproteasen und virale Cysteinproteasen ähnliche Aminosäure-Abfolgen aufweisen können, werden durch bestimmte Proteasen viralen Ursprungs deutlich weniger unerwünschte Spalt-

produkte gebildet.^[150] Bedingt durch die erhöhte Spezifität dieser Cysteinproteasen und deren verminderte Katalysegeschwindigkeiten sind nicht zu den betreffenden Epitopen gehörende Amidbindungen seltener von unspezifischen Proteolysereaktionen betroffen. Ein aus materialwissenschaftlicher Perspektive entscheidender Vorteil hinsichtlich der Verwendung viraler Enzyme besteht darin, dass die katalytisch aktiven Proteine in hohen Ausbeuten in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und als hochreine Produkte isoliert werden können.^[150]

Eine der am besten charakterisierten Cysteinproteasen stellt die TEV Protease dar.^[159] Dabei handelt es sich um die katalytisch aktive Domäne des NIa Proteins (engl. *nuclear inclusion protein Ia*) aus Einschlüssen des Zellkerns, welche durch den Tabakätzvirus gebildet werden.^[160] Im C-terminalen Bereich befindet sich mit einer molekularen Masse von 27 kDa^[161] die enzymatisch aktive Domäne des viralen Proteins, dessen katalytische Triade aus den Aminosäuren His⁴⁶ (Base), Asp⁸¹ (Säure) und Cys¹⁵¹ (Nukleophil) gebildet wird (vgl. **Abbildung 2.4a**).^[162, 163] Das Enzym erkennt das aus sieben Aminosäuren bestehende lineare Epitop ENLYFQ↓G, wobei hochspezifisch die Amidbindung zwischen Glutamin und Glycin gespalten wird.^[155, 156]

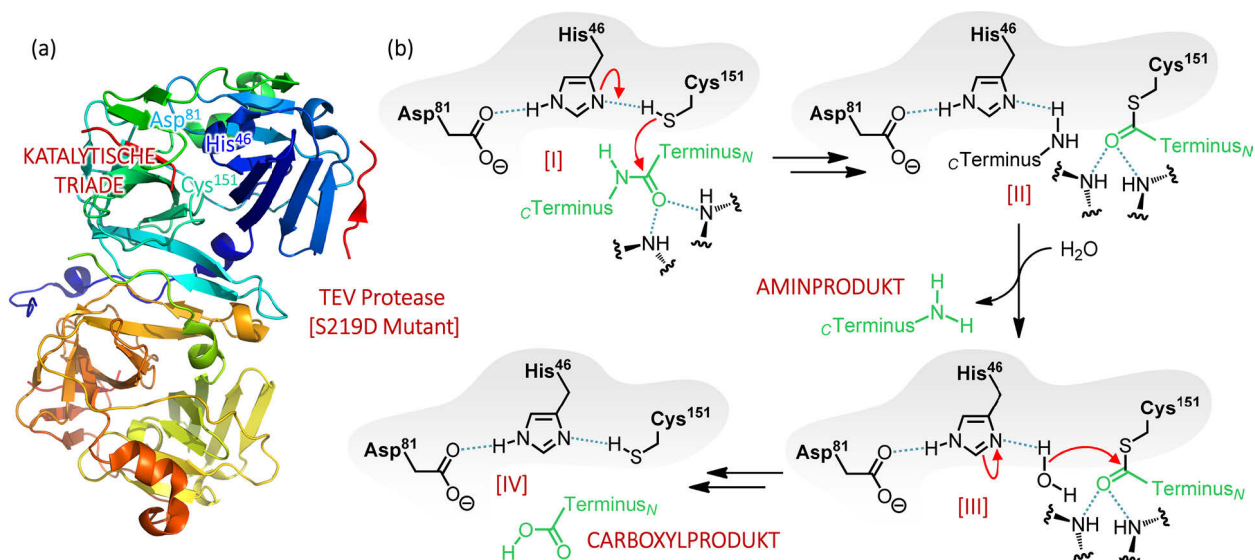


Abbildung 2.4. Dimerisierte Kristallstruktur der TEV Protease (S219D Mutant)^[162] im Bändermodell unter Angabe der katalytischen Triade His⁴⁶, Asp⁸¹ und Cys¹⁵¹ (a). PDB ID: 1LVM.^[164] Vereinfachter Ablauf ausgewählter Reaktionsschritte einer enzymatischen Hydrolyse am Beispiel des aktiven Zentrums der TEV Protease (b).^[165, 166] Nach Koordination des Substrates [I] in der Bindungstasche der Protease erfolgt die Spaltung der Amidbindung unter Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediates und eines an His⁴⁶ koordiniertes C-terminales Aminprodukt [II]. Der Austausch durch ein Wassermolekül bewirkt die Freisetzung des zuvor assoziierten Aminproduktes [III] und führt zur Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates unter Bildung des N-terminalen Carboxylproduktes und der Regenerierung des aktiven Zentrums [IV].

Die Katalysezyklen viraler Cysteinproteasen wie der TEV Protease sind noch nicht vollständig aufgeklärt, auch wenn Parallelen zu den katalytischen Triaden von Serinproteasen vermutet werden.^[166] **Abbildung 2.4b** zeigt einen vereinfachten Ablauf ausgewählter Reaktionsschritte der durch die TEV Protease induzierten Hydrolyse in Anlehnung an den katalytischen Mechanismus der pflanzlichen Cysteinprotease Papain.^[165, 166] Nach der Koordination des Peptid-Proteasesubstrates [I] in der Bindungstasche des Enzyms erfolgt die Spaltung der Amidbindung der enzymespezifischen Erkennungssequenz ENLYFQ↓G zwischen Glutamin und

Glycin, wobei ein Acyl-Enzym-Intermediat sowie ein an den Imidazolring von His⁴⁶ koordiniertes C-terminales Aminprodukt gebildet werden [II]. Der dabei entscheidende Schritt ist ein nukleophiler Angriff des Thiols von Cys¹⁵¹ bei gleichzeitigem Transfer eines Protons auf den Imidazolring von His⁴⁶ unter Bildung eines Imidazolium-Ions (Struktur hier nicht gezeigt). Der nachfolgende Austausch eines Wassermoleküls im nächsten Schritt bewirkt die Freisetzung des zuvor assoziierten Aminproduktes [III]. Durch hydrolytische Spaltung des Acyl-Enzym-Intermediates wird das N-terminale Carboxylprodukt gebildet und gleichzeitig das aktive Zentrum der Cysteinprotease regeneriert [IV].

Kommerziell verfügbare Versionen der TEV Protease werden in der Regel mit einem Affinitätstag fusioniert, um die Abtrennung des Enzyms nach dem Substratverdau zu erleichtern.^[167] Zusätzlich wird das Enzym gegenüber dem Wildtyp gentechnisch verändert, um autolytischen Abbaumechanismen zwischen den Aminosäuren Met²¹⁹ und Ser²²⁰ vorzubeugen (z. B. S219D Mutant) und die katalytische Aktivität zu steigern.^[162] Darüber hinaus zeigt die TEV Protease katalytische Aktivität über einen weiten pH-Bereich und ist gegenüber typischen Inhibitoren für Serin- oder Cysteinproteasen unempfindlich.^[168] Die hohe Spezifität und Robustheit des Enzyms bietet somit eine attraktive Möglichkeit zur gezielten Aktivierung von Peptid-Polymer-Konjugaten. Erst kürzlich wurde die virale Cysteinprotease vom Arbeitskreis BECKER in die Darstellung hochreiner Glycopeptide involviert, um deren Isolierung nach einem ebenfalls enzymatisch induzierten Glycosylierungsprozess zu verbessern.^[169] Die quantitative Biotransformation PEGylierter Vorläufersequenzen mittels der TEV Protease ermöglichte die selektive Freisetzung O-glycosylierter Peptide unter Abspaltung des synthetischen Polymer-Blockes. Der selektive Wirkmechanismus der TEV Protease qualifiziert das Enzym als einen substratspezifisch agierenden Stimulus zur Aktivierung der Struktur oder Funktion enzymresponsiver Biokonjugate für medizinische und materialwissenschaftliche Anwendungen. Ein bisher noch nicht näher beleuchteter Anwendungsbereich verbindet peptidbasierte Adhäsionsdomänen mit bioinerten Polymeren zu Biokonjugaten, die proteinresistente Beschichtungen auf verschiedensten Oberflächen ausbilden können. In der vorliegenden Arbeit sollen diese durch die enzymatische Prozessierung entsprechend nicht-bindender Vorläufer erzeugt werden. Um weitere Einblicke in das Forschungsfeld zu gewähren, werden im nachstehenden Kapitel etablierte Strategien zur Unterbindung unerwünschter Proteinablagerungen auf Oberflächen erläutert.

2.5 Peptid-Polymer-Konjugate als proteinresistente Beschichtungen

Die unerwünschte Adsorption von Proteinen oder Bakterien und die daraus folgende Ausbildung biologischer Filme auf Materialoberflächen kann unter dem Begriff *Biofouling* – abgeleitet von dem englischen Wort für Bewuchs *fouling* – zusammengefasst werden.^[170, 171] Die unspezifischen Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen flüssiger und fester Phase ist eine weitreichende Problematik für Materialien und Technologien, die in medizinischen Behandlungen verwendet werden. Blutplasmae Proteine und infektiöse Bakterien lagern sich auf Geräten oder chirurgischen Implantaten ab, können dadurch lebensbedrohliche Immunreaktionen auslösen und im Falle einer Implantation letztendlich sogar zur Abstoßung des Materials führen.^[172] Nach dem aktuellen Kenntnisstand konnte bisher keine vollständig proteinresistente Ober-

fläche künstlich erzeugt werden.^[173, 174] Folglich stellt das Unterbinden der unspezifischen Proteinadsorption durch geeignete Antifouling-Beschichtungen eine unumgängliche Herausforderung für die medizinische Forschung dar.^[175]

2.5.1 ANTIFOULING-STRATEGIEN

Antifouling-Strategien befassen sich mit der Modifikation und Beschichtung (engl. *coating*) einer Materialoberfläche (vgl. **Abbildung 2.5**).^[176] Präventive Maßnahmen minimieren dabei den direkten Kontakt einer Oberfläche mit der umgebenden Flüssigkeit, infolgedessen das Material von Proteinen und Bakterien nicht mehr adressiert werden kann.^[177] Den präventiven Strategien gegenüber stehen antimikrobielle Beschichtungen, welche bei der Annäherung von Bakterien an die Oberfläche die Zellmembran angreifen, wodurch die adhäsive Verbindung abgetötet wird.^[178] Letztere werden durch antibakteriell wirkende Substanzen wie Silberionen^[179, 180] oder antimikrobielle Peptide^[181] erzeugt, welche von auf der Oberfläche aufgetragenen Trägermaterialien lokal freigesetzt werden (vgl. **Abbildung 2.5d**). Diese Methode ist jedoch nicht für Langzeitanwendungen geeignet, da die antimikrobiellen Verbindungen mit der Zeit verbraucht werden. Darüber hinaus können AMPs toxische oder immunogene Reaktionen auslösen und zu Resistenzen der Bakterien führen.^[182, 183] Alternativ können kontaktaktive Substanzen wie kationische Polymere,^[184] AMPs^[185, 186] oder Enzyme^[187, 188] über biokompatible Linker auf der Oberfläche immobilisiert werden (vgl. **Abbildung 2.5e**). Da für diese Strategie jedoch in Abhängigkeit von der antimikrobiellen Substanz und dem Anwendungsbereich Optimierungsbedarf besteht, sind vorbeugende Maßnahmen zur Unterbindung der unspezifischen Adsorption von Proteinen und Bakterien zu bevorzugen.^[175]

Zur Prävention der Oberflächenhaftung pathogener Bakterien können unter anderem anionische Polymere verwendet werden.^[175] Durch die Immobilisierung der Polymerketten wird eine negative Oberflächenladung erzeugt. Die elektrostatische Abstoßung der Bakterien bedingt durch deren überwiegend anionische Zellmembranen kann die Ausbildung von Biofilmen entscheidend reduzieren (vgl. **Abbildung 2.5b**).^[189] Fluorhaltige Polymere können unerwünschte Proteinablagerungen auf Oberflächen ebenfalls unterbinden.^[190] Die unpolaren Verbindungen bilden glatte und unporöse Beschichtungen und vermindern unspezifische Adsorptionsprozesse durch Herabsetzung der Oberflächenenergie (vgl. **Abbildung 2.5c**).^[191, 192] Die am häufigsten verwendete präventive Antifouling-Strategie – für potentielle biomedizinische Anwendungen – beruht auf der PEGylierung der Materialoberfläche, wobei das Polymer sowohl kovalent gebunden als auch durch Chemisorption oder Physisorption aufgetragen werden kann.^[177] Mit Poly(ethylenglycol) beschichtete Oberflächen besitzen eine geringe Grenzflächenenergie gegenüber Wassermolekülen, weshalb die hydratisierten Polymerketten die Zugänglichkeit der Oberfläche für adhäsive Proteine und infektiöse Bakterien und sterisch einschränken (vgl. **Abbildung 2.5a**).^[66] Unter anderem kommen PEGylierte Materialien in medizinischen Geräten und orthopädischen Implantaten zum Einsatz.^[193] Kovalente Polymer-Beschichtungen können mittels traditioneller Ligationstechniken^[177] oder *grafting*-basierter Methoden^[194, 195] sowie durch plasmainduzierte Ablagerungen von Oligo(ethylenglycol)en^[196, 197] erzeugt werden. Die Abschirmung der Oberfläche kann mit der Größe des Polymers verbessert

werden.^[198] Da der Bedeckungsgrad durch den sterischen Anspruch der Polymerketten limitiert ist, werden unspezifische Adsorptionsvorgänge dennoch nicht vollständig unterbunden.^[175] Durch selbstorganisierte Monolagen (SAMs, engl. *self-assembled monolayers*,)^[199] kann diese Problematik umgangen werden. Der Arbeitskreis WHITESIDES präsentierte die chemisorptive Methodik im Zusammenhang mit Alkanthiolen zur effektiven Beschichtung von Goldoberflächen.^[200] Um eine fehlerfreie und homogene PEG-Beschichtung des Edelmetalls realisieren zu können, ist jedoch eine planare kristalline Oberfläche erforderlich.^[201]

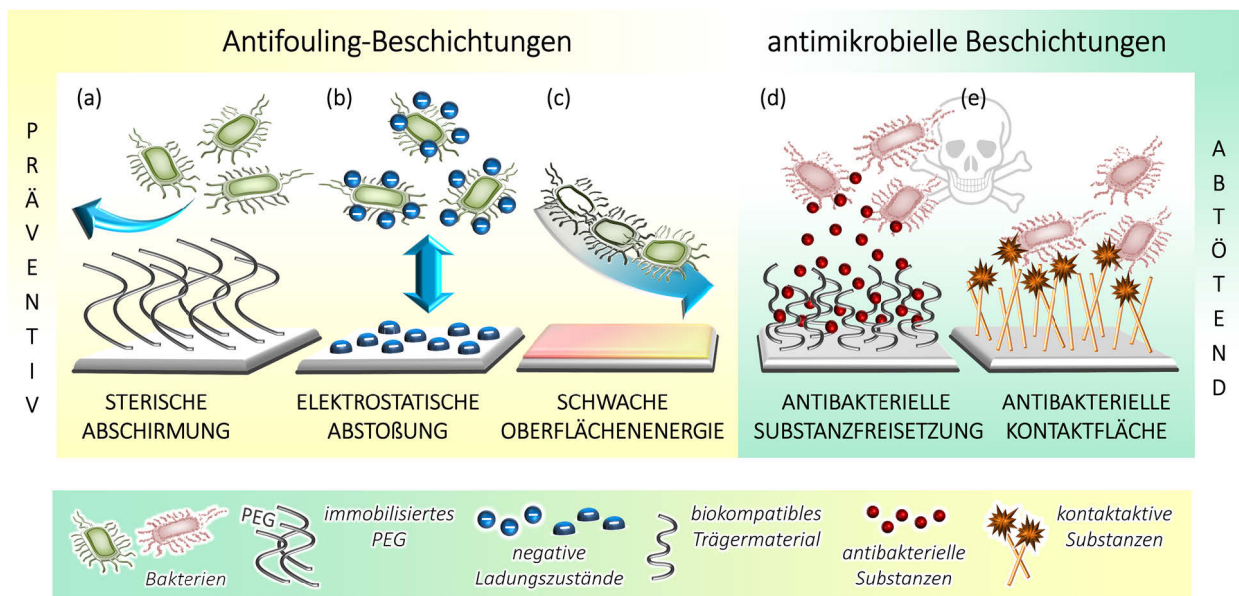


Abbildung 2.5. Strategien zur Unterbindung der unspezifischen Adsorption von Proteinen und Bakterien:^[176] Präventive Antifouling-Beschichtungen bewirken eine sterische Abstoßung durch immobilisiertes Poly(ethylenglycol) (a), basieren auf der elektrostatischen Abstoßung durch eine negative Oberflächenladung (b) oder führen zu einer Herabsetzung der Oberflächenenergie (c). Antimikrobielle Beschichtungen dienen der Abtötung adhäsiver Komponenten bei Annäherung an die Oberfläche durch Freisetzung antibakteriell wirkender Substanzen (d) oder durch immobilisierte kontaktaktive Verbindungen (e). Abbildung nach Referenz ^[176].

Im Gegensatz zu der kovalenten Immobilisierung bietet die Verwendung PEGylierter Peptid-adhäsionsdomänen eine elegante Möglichkeit, das bioinerte Polymer auf Materialoberflächen aufzubringen. Dabei führt die peptidinduzierte Adsorption zu einer hohen Dichte der Poly(ethylenglycol)-Ketten auf der Zieloberfläche, wodurch effektive Antifouling-Beschichtungen gebildet werden können.^[202, 203]

2.5.2 PEPTID-PEG-KONJUGATE ZUR PRÄVENTION VON BIOFOULING

Die Verbindung aus peptidbasierten Adhäsionsdomänen und Poly(ethylenglycol)en offeriert ein weitreichendes Potential, spezifische und bioinerte Oberflächen zu erzeugen.^[177] Insbesondere metallische Materialien wie beispielsweise Titan stehen im Fokus der wissenschaftlichen Forschung, durch adhäsive Peptid-PEG-Konjugate selektiv beschichtet zu werden. Aufgrund seines geringen Gewichtes im Vergleich zu anderen Metallen und seiner hohen Beständigkeit unter physiologischen Bedingungen findet Titan häufig Verwendung in Zahnimplantaten oder künstlichen Gelenken.^[204, 205] Einfache Varianten zur Beschichtung der oxidierten Metall-

oberfläche involvieren beispielsweise Poly-L-Lysin-g-PEG-Konjugate (PLL-g-PEG) oder kombinierte Varianten mit PEGylierten Systemen der Zelladhäsionsdomäne RGD.^[206] Ungeachtet der effektiv reduzierten Proteinablagerung ist die Adsorption der positiv geladenen Lysin-Seitenketten jedoch materialunspezifisch, weshalb vorwiegend nur anionische Oberflächen mit PLL-g-PEG beschichtet werden können.^[207]

Inspiziert von den Proteinen aus dem Bysussfaden der gemeinen Miesmuschel (lat. *Mytilus edulis*)^[208-210] synthetisierte der Arbeitskreis MESSERSMITH eine Reihe verschiedener L-Dopahaltiger Polymere.^[211-213] Die adhäsive Aminosäure L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) wird posttranslational aus L-Tyrosin durch die integrierte Monophenolase-Aktivität gebildet.^[214] Die PEGylierung des L-Dopa-Bindungsmotives ermöglichte die Ausbildung proteinresistenter Beschichtungen für Titandioxid-Oberflächen mit effektiven Antifouling-Eigenschaften gegenüber Humanserum.^[212] Im Hinblick auf potentielle materialwissenschaftliche Anwendungen sind diese Systeme aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit von L-Dopa jedoch nur bedingt lagerfähig, weshalb stabilisierende und reduktive Zusätze erforderlich sind.^[215]

Um diese Problematik zu umgehen, entwickelte die Arbeitsgruppe BÖRNER enzymatisch aktivierbare Adhäsive nach dem Vorbild der marinen Muschel,^[23, 24] deren integrierte Monophenolase-Aktivität die Aminosäure-Seitenketten von L-Tyrosin in L-Dopa überführen kann.^[214] Dabei wurde zunächst eine PEGylierte Variante der schwach-bindenden Vorläufersequenz AKPSYPPTYK eines Muschelfußproteins mittels einer kommerziell erhältliche Variante der Tyrosinase prozessiert.^[23] Anschließend wurde die Oberfläche von rostfreiem Stahl mit dem aktivierten Biokonjugat beschichtet und mittels Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsaufzeichnung (QCM-D, engl. *quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*) charakterisiert. Die Messungen ergaben eine effektive Proteinresistenz von 99 % gegenüber Rinderserumalbumin (BSA, engl. *bovine serum albumin*) und 87 % gegenüber verdünntem Humanserum.^[23] Dieses Konzept wurde dahingehend erweitert, dass in einem biokombinatorischen Ansatz tyrosinaseresponsive Peptidsubstrate für Aluminiumoxid-Oberflächen mittels Phagen-Display *de novo* selektiert wurden.^[24] Nach C-terminaler PEGylierung ($M_n = 3.2 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) der nicht-aktivierten Vorläufersequenzen wurden die enthaltenen L-Tyrosin-Seitenketten durch das kupferhaltige Metalloenzym zu den entsprechenden L-Dopa-Bindungsmotiven oxidiert. Die Beschichtungen der aktivierten Biokonjugate konnten die unspezifische Oberflächenhaftung des Serumproteins BSA vollständig unterbinden bzw. die des reinen Humanserums um bis zu 95 % reduzieren und bieten Potential für *in situ* Antifouling-Anwendungen.^[24]

Die Integration enzymatisch aktivierbarer Bindungsmotive in Peptid-PEG-Konjugate bietet somit eine innovative Möglichkeit, unerwünschte Proteinablagerungen auf Metalloxid-Oberflächen zu unterbinden. Auf der Basis proteolytischer Enzyme konnte die Biotransformation PEGylierter Adhäsionsdomänen bisher noch nicht gezeigt werden. Aufgrund der häufigen Verwendung von Titan stellt die Entwicklung proteinresistenter Beschichtungen für die oxidierten Metalloberflächen eine anwendungsrelevante Zielsetzung dar. Für Titanoxid-Oberflächen spezifische Adhäsionsdomänen können für gewöhnlich mittels der biokombinatorischen Methodik des Phagen-Displays identifiziert werden.^[216-219]

2.6 Peptidbasierte Adhäsionsdomänen für Titandioxid-Oberflächen

Das Phagen-Display ermöglicht die gezielte Selektion adhäsiver Peptiddomänen für die verschiedensten Materialien wie Metalle, Metalloxide, Polymere oder Halbleiter aus größeren, rekombinanten Peptid-Bibliotheken.^[217] Im Vergleich zum rationalen Design wird durch die biotechnologische Methode das komplexe Zusammenspiel von Peptid-Sekundärstruktur und haftungsvermittelnden Aminosäure-Seitenketten zur Erzeugung der gewünschten Oberflächenspezifität optimal verwertet.^[220] Hinzu kommt, dass die Beschaffenheit einer Oberfläche durch die Morphologie des Materials bestimmt wird und die damit verbundenen Ladungszustände oberflächennaher Atome durch rationale Ansätze oftmals nur schwer zu erfassen sind. Die Oberfläche von metallischem Titan beispielsweise bildet in Gegenwart von Sauerstoff spontan eine dünne oxidierte Schutzschicht, welche sich aus amorphem und nicht-stöchiometrischem Titandioxid zusammensetzt.^[221] Unter wässrigen Bedingungen präsentiert die Oberfläche die Sauerstoffatome in Form von Hydroxylgruppen ($-\text{Ti}-\text{OH}$), welche sowohl als zweifach protonierte ($-\text{Ti}-\text{OH}_2^+$) als auch anionische ($-\text{Ti}-\text{O}^-$) Spezies vorliegen können.^[222] Dementsprechend agieren Titandioxid-Oberflächen als schwache BRØNSTED-Basen mit amphoteren Eigenschaften. Der isoelektrische Punkt (IEP, engl. *isoelectric point*) der Oberfläche liegt in Abhängigkeit von der Metalllegierung und des Herstellungsprozesses in einem Bereich zwischen 4.7 – 6.2.^[223] Daher werden aufgrund der negativen Gesamtladung der Oberfläche bei neutralen pH-Werten in der Regel Peptidsequenzen mit kationischen Aminosäuren unspezifisch akkumuliert.^[224] Jedoch weist die amphotere Metalloxid-Oberfläche sowohl positiv als auch negative geladene Bindungsstellen auf, weshalb spezifische Adhäsionsdomänen für TiO_2 bevorzugt mittels Phagen-Display selektiert werden.^[225-229]

2.6.1 MULTIVALENTE OBERFLÄCHENSPEZIFISCHE ADHÄSIVE

Der Arbeitskreis GRINSTAFF identifizierte durch die Selektionsmethode des Phagen-Displays – in Verbindung mit Aminosäure-Substitutionsexperimenten – die trimere Peptiddomäne HKH als einen starken Binder für Titandioxid-Oberflächen.^[202] Die Integration dieses Motives als dreifache Wiederholungseinheit in ein lineares 18-mer bewirkte eine hundertfache Verstärkung der Oberflächenhaftung im Vergleich zu der ursprünglich selektierten Peptidsequenz. Nach der PEGylierung ($M_n = 3.4 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) des C-Terminus wurden die proteinresistenten Eigenschaften des Peptid-Polymer-Konjugates mittels QCM-D analysiert. Dabei konnte eine vollständige Abschirmung gegenüber dem extrazellulären Glykoprotein Fibronectin sowie eine verminderte Ablagerung des Bakteriums *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) verzeichnet werden.^[202] Der anpassungsfähige Erreger steht in Verbindung mit antibiotikaresistenten Infektionen in medizinischen Versorgungsbereichen.^[230] Auch wenn eine signifikante Verminderung der Bakterienbesiedlung auf der Metalloxid-Oberfläche beobachtet wurde, zeigte die Biokonjugat-Beschichtung nur eine begrenzte Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Daher wurde zur Verbesserung der Haftungseigenschaften auf das chemische Wirkprinzip der Multivalenz zurückgegriffen.^[231, 232] Dieses involviert repetitive Einheiten einer Bindungsmotives mit dem Ziel, die Wechselwirkungen zwischen System und Oberfläche zu verstärken. Auf dieser Grund-

lage erarbeitete die Arbeitsgruppe GRINSTAFF eine zweite Generation von Adhäsionsdomänen, wobei das Trimer KHK als Binder für Titandioxid-Oberflächen ermittelt wurde.^[203] Das Motiv wurde als dreifache Wiederholungseinheit zu einer 15-mer Adhäsionsdomäne angeordnet und sowohl in Form einer monovalenten Peptidsequenz als auch durch synthetische Verzweigungspunkte erzeugte divalente und tetravalente Peptiddomänen mit einem linearen PEG-Block verbunden (vgl. **Abbildung 2.6 mittig bzw. rechts**). Dabei zeigte der tetravalente Binder eine zehnfach stärkere Oberflächenhaftung auf TiO₂ im Vergleich zum linearen Äquivalent, wobei in Gegenwart von Humanserum etwa 90 % der ursprünglichen Biokonjugat-Beschichtung noch nach zwei Wochen erhalten waren. Darüber hinaus demonstrierte die tetravalente Beschichtung *in vitro* eine 90 %ige Reduktion der Biofilmbildung durch das Bakterium *S. aureus*.^[203]

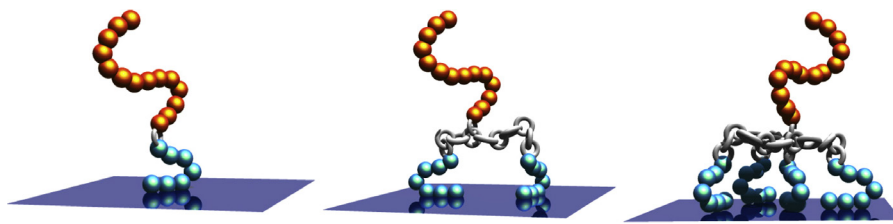


Abbildung 2.6. Graphische Darstellung zur Verdeutlichung des Multivalenzprinzips im Zusammenhang mit linearen monovalenten (**links**) und verzweigten di- bzw. tetravalenten Peptid-PEG-Konjugaten (**mittig und rechts**). Die Peptidsequenzen sind in blau, die PEG-Blöcke in gold und die Linker-Moleküle in grau abgebildet.^[203] Reprinted with permission from X. Khoo, G. A. O'Toole, S. A. Nair, B. D. Snyder, D. J. Kenan, M. W. Grinstaff, *Biomaterials* **2010**, 31, 9285-9292. Copyright 2010 Elsevier.

Die multiple Verknüpfung peptidbasierter Adhäsionsdomänen mit Poly(ethylenglycol) bietet somit einen progressiven Ansatz, stabile und proteinresistente Beschichtungen für Titandioxid-Oberflächen zu erzeugen. Die Integration dieses Prinzips in materialwissenschaftliche Konzepte basierend auf der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten mittels Proteasen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Im Zusammenhang mit der oberflächenspezifischen Haftung mittels Phagen-Display selektierter Adhäsionsdomänen kann die Sequenz RKLDPAPGMHTW hervorgehoben werden, welches in der Literatur als titanbindendes Peptid **TBP** (engl. *Ti-binding Peptide TBP-1*) bezeichnet wird. Zur Aufklärung der adhäsiven Eigenschaften des linearen 12-meres ist das Zusammenwirken zwischen Aminosäure-Seitenketten, Peptidrückgrat und Oberflächenladung bereits umfassend untersucht worden.

2.6.2 DAS TITANBINDENDE PEPTID

Im Jahr 2003 identifizierte der Arbeitskreis SHIBA via Phagen-Display die lineare Peptidsequenz RKLDPAPGMHTW (**TBP**) als effizienten Binder für Titandioxid-Partikel.^[233] Gemäß QCM-D-Messungen zeigte die selektierte Adhäsionsdomäne eine hohe Spezifität für die anorganischen Oberflächen von TiO₂ und SiO₂, wohingegen keine bzw. eine geringere Haftung auf einer Vielzahl von anderen Metalloberflächen verzeichnet wurde.^[234] Durch Alanin-Substitutionsexperimente wurden die für die Oberflächenhaftung verantwortlichen Aminosäuren der Peptidsequenz **TBP** bestimmt.^[233] Der Austausch von Arginin (R¹), Asparaginsäure (D⁵) und Prolin (P⁴) gegen Alanin führte zu deutlich verminderten elektrostatischen Wechselwirkungen

mit den TiO_2 -Partikeln, während die Substitution der verbleibenden Aminosäuren keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Bindung ausübte. Diese Analyse legte die Vermutung nahe, dass die Oberflächenhaftung von **TBP** vornehmlich durch den *N*-terminalen Bereich der 12-mer Peptiddomäne hervorgerufen wird und die Aminosäuren des *C*-terminalen Abschnittes nur geringfügig beteiligt sind. Gleichermäßen entscheidend für das Verständnis des Adsorptionsverhaltens der Adhäsionsdomäne **TBP** ist die pH-Abhängigkeit der oxidierten Oberfläche. Bei pH 7.5 wurden – entsprechend des amphoteren Charakters der Oxidschicht – neben positiv geladenen Aminosäuren wie R^1 auch negativ geladene wie D^5 an der Oberfläche akkumuliert.^[233] Hervorgehend aus diesen Überlegungen konnte ein Modell entwickelt werden, welches das *N*-terminale Hexamer **RKLPDA** (**TBP6**) als zentrales Bindungsmotiv von **TBP** für Titandioxid-Partikel beschreibt. Nach diesem adhären R^1 und D^5 an derselben Oberfläche, während das heterocyclische Prolin (P^4) in der *cis*-Konfiguration vorliegt und zu einem Abknicken des Peptidrückgrates führt.^[233] Die Seitenkette von R^1 als LEWIS-Base wechselwirkt dabei elektrostatisch mit $-\text{Ti}-\text{O}-$, wohingegen die LEWIS-Säure D^5 mit $-\text{Ti}-\text{OH}_2^+$ interagieren kann. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen bestätigten die ladungsbasierten Wechselwirkungen von **TBP6** mit der Metalloxid-Oberfläche.^[235] Weshalb Lysin (K^2), welches aufgrund der positiv geladenen Seitenkette mit TiO_2 interagieren könnte, nicht an der Haftung von **TBP** beteiligt ist, konnte an Hand des postulierten Modells nicht erklärt werden.

Weitere Ergebnisse zur Aufklärung der adhäsiven Eigenschaften von **TBP** lieferte 2011 der Arbeitskreis MIRAU durch hochauflösende Kernresonanzspektroskopie-Methoden (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*). Diese ermöglichten die Bestimmung von Struktur und Orientierung des Peptides auf Silicium- und Titandioxid-Nanopartikeln bei neutralen pH-Werten.^[236] Dabei sollte vorrangig ermittelt werden, weshalb der Austausch der Aminosäure Lysin (K^2) durch ein hydrophobes Alanin zu einer verstärkten Oberflächenhaftung der Adhäsionsdomäne führte.^[233]

Abbildung 2.7 zeigt die aus den NMR-Experimenten hervorgehende dreidimensionale Struktur des hexameren Bindungsmotives **TBP6** im Vergleich zu den Alanin-substituierten Peptidsequenzen **A2TBP6** und **A2TBP12** auf SiO_2 -Nanopartikeln.^[236]

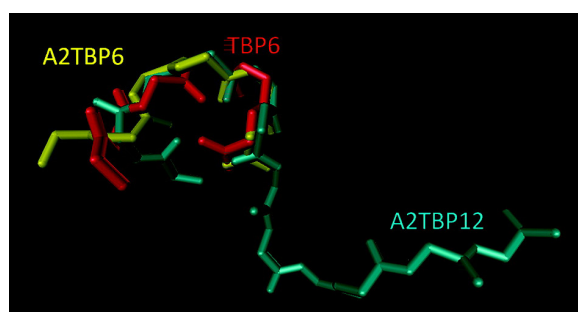


Abbildung 2.7. An Hand NMR-spektroskopischer Methoden bestimmte dreidimensionale Struktur des *N*-terminalen Bindungsmotives **TBP6** der Adhäsionsdomäne **TBP** im Vergleich zu den Alanin-substituierten Peptidsequenzen **A2TBP6** und **A2TBP12** und deren Anordnung bei der Haftung auf SiO_2 -Nanopartikeln (nur das Rückgrat der Peptidsequenzen ist gezeigt).^[236] Reprinted with permission from P. A. Mirau, R. R. Naik, P. Gehring, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 18243-18248. Copyright 2011 American Chemical Society.

Aus dieser geht hervor, dass durch die Anbindung der Peptidsequenz über die Aminosäuren Arginin (R^1) und Asparaginsäure (D^5) die Seitenketten von Leucin (L^3) und Alanin (A^6) der

Oberfläche entgegengerichtet werden. Gleichzeitig wird das Peptidrückgrat von **TBP6** bedingt durch die konformellen Starrheit des Prolins (P⁴) partiell in „die Form des Buchstaben „C““ dirigiert. Möglicherweise bewirken ionische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Arginin (R¹) und Lysin (K²) eine bessere Verankerung des hexameren Bindungsmotives auf der Partikel-Oberfläche. Gleichzeitig wird die kationische Seitenkette von Lysin (K²) nach außen gedreht und kann keine weiteren Interaktionen mit SiO₂ eingehen.

Die Aktivierung der Oberflächenhaftung der Adhäsionsdomäne **TBP** hervorgehend aus einem inaktiven Vorläufer auf Grundlage des bindungsspaltenden Wirkmechanismus proteolytischer Enzyme konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Für die Charakterisierung von Adsorptions- und Desorptionsvorgängen adhäsiver Peptiddomänen bzw. entsprechend PEGylierter Systeme auf Titandioxid-Oberflächen eignen sich Techniken wie die Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsaufzeichnung hervorragend.

2.7 Aufklärung adhäsiver Wechselwirkungen zwischen biomakromolekularen Strukturen und Oberflächen

2.7.1 QUARZKRISTALL-MIKROWAAGE MIT DISSIPATIONS-AUFZEICHNUNG

Die Technik der QCM-D ermöglicht *in situ* Untersuchungen von Wechselwirkungen und Adsorptionsprozessen der verschiedensten Verbindungen auf einer Vielzahl von Materialoberflächen in flüssigen Medien oder in der Gasphase.^[237, 238] Insbesondere die Interaktionen biomakromolekularer Strukturen und synthetischer Polymere mit sowohl organischen als auch anorganischen Oberflächen können charakterisiert werden.^[238-240] Das Messprinzip der Quarzkristall-Mikrowaage beruht auf der resonanten Anregung eines Sensors aus Quarzkristall durch das Anlegen einer Wechsellspannung, wodurch dieser mit einer bestimmten Frequenz oszilliert.^[241] Die Materialanreicherung einer Komponente auf der Sensoroberfläche bewirkt eine Massenzunahme auf dem Kristall, so dass dessen Resonanzfrequenz abnimmt. Die Technik erlaubt eine Detektion adsorbierter Massen im Nanogrammbereich.^[242]

In Abhängigkeit von der Elastizität der erhaltenen Beschichtung können für die Beschreibung der Adsorptionsvorgänge und der damit verbundenen Massenänderungen zwei verschiedene Modelle herangezogen werden. Während durch das VOIGT-Modell viskoelastische Schichten quantitativ interpretiert werden können, dient das SAUERBREY-Modell zur Charakterisierung rigider Filme, welche starr auf der Oberfläche gebunden werden. Der lineare Zusammenhang zwischen den Frequenzänderungen Δf [Hz] und den adsorbierten Massen $\Delta m_{\text{SAUERBREY}}$ [ng·cm⁻²] wird durch die SAUERBREY-Gleichung^[243] beschrieben (**Gleichung 1**):

$$\Delta m_{\text{SAUERBREY}} = -\frac{C}{n} \cdot \Delta f_n \quad (\text{Gleichung 1})$$

Hierbei entspricht C der Massenempfindlichkeitskonstante ($C = 17.7 \text{ ng} \cdot \text{Hz}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ für einen 5 MHz Quarzkristall) und n der Anzahl von Frequenzobertönen ($n = 1, 3, 5, \dots, 13$). Unter der Voraussetzung, dass diese Masse im Vergleich zu der des Kristalls deutlich geringer ausfällt und sowohl starr als auch gleichmäßig auf der gesamten Sensoroberfläche adsorbiert, kann das

SAUERBREY-Modell direkt auf ein reales System übertragen werden.^[237] Dies trifft in der Regel jedoch nur auf sehr dünne und rigide Filme zu, welche eine minimale Frequenzänderung der verschiedenen Obertöne hervorrufen. Die Adsorption biomakromolekularer Strukturen wie Proteinen an der Grenzfläche zwischen festen und flüssigen Phasen dagegen erzeugt viskoelastische Schichten auf einer Materialoberfläche.^[244] Diese können der Oszillation der Quarzkristalle nicht exakt folgen sondern dämpfen deren Schwingungen.^[242] In diesem Zusammenhang wurden QCM-Techniken mit simultaner Bestimmung des Dissipationsfaktors D [dimensionslos] entwickelt, wobei der Sensor nach der Anregung frei schwingen kann.^[245-248] Die Dissipation ist ein Maß für den Reibungsverlust des Systems und wird durch folgenden Zusammenhang wiedergegeben (**Gleichung 2**):

$$D = \frac{E_{DISSIPATION}}{2\pi \cdot E_{GESPEICHERT}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Dabei entspricht $E_{DISSIPATION}$ der Energie, die während eines Oszillationszyklus abgegeben wird und $E_{GESPEICHERT}$ der im System verbleibenden Energie. Aufgrund der Dämpfungseigenschaften viskoelastischer Filme werden deren adsorbierten Massen durch das SAUERBREY-Modell unterbewertet.^[249] Das VOIGT-Modell dagegen erlaubt durch die mathematische Verknüpfung der Änderungen von Frequenz Δf und Dissipation ΔD eine exaktere Berechnung der Massen-anlagerung unter Berücksichtigung von Dichte, Viskosität, Elastizität und Schichtdicke der viskoelastischen Filme.^[250, 251] Eine detaillierte Beschreibung zur Bestimmung der adsorbierten Massen Δm_{VOIGT} [$\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}$] und Schichtdicken d_{VOIGT} [nm] nach VOIGT durch das Anlegen einer Näherungsfunktion kann **Kapitel 5.3.3.4** (vgl. Seite 114) entnommen werden. Für Messungen in wässrigen Medien ist zu beachten, dass bei der Adsorption von Proteinen oder Peptiden Wassermoleküle in die Beschichtung eingelagert werden. Dementsprechend schwingen die gebundenen Wassermoleküle der auf der Oberfläche angelagerten Masse ebenfalls mit, weshalb die nach dem VOIGT-Modell berechnete Masse keinen direkten Rückschluss auf die Stoffmenge einer haftenden Komponente zulässt.^[249] Die vielfältigen Möglichkeiten zur Aufklärung und Auswertung der Adsorptions- und Desorptionsvorgänge biomakromolekularer Strukturen auf Oberflächen prädestiniert die QCM-D-Technik als zentrale Analysemethode der vorliegenden Arbeit. Dabei sollen die adhäsiven Eigenschaften enzymresponsiver Peptid-PEG-Konjugate untersucht werden, welche durch die proteolytische Prozessierung entsprechend nicht-aktivierter Vorläufer proteinresistente Biokonjugat-Beschichtungen bilden können.

Das Verständnis der adhäsiven Wechselwirkungen zwischen biomakromolekularen Strukturen und Materialoberflächen bildet die Grundlage für die Entwicklung bioinertter und biospezifischer Beschichtungen.^[173, 174] Neben der Quarzkristall-Mikrowaage existiert eine Vielzahl weiterer Technologien, um die Haftungseigenschaften biologischer Verbindungen zu analysieren. Für biomedizinische und pharmazeutische Forschungen und daraus hervorgehende Anwendungen werden vor allem markierungsfreie Methoden favorisiert. Diese ermöglichen eine direkte Bestimmung der Oberflächenaffinität eines Systems in natürlicher Umgebung, ohne dass die Messergebnisse durch eine Markierungseinheit verfälscht werden können.^[252] Insbesondere kraftbasierte Techniken wie beispielsweise die Rasterkraftmikroskopie (AFM, engl. *atomic force microscopy*) liefern zuverlässige Informationen hinsichtlich der adhäsiven und

mechanischen Eigenschaften biomakromolekularer Strukturen und gewährleisten die dafür notwendige hohe Sensitivität.^[253] Ein spezielles und im Vergleich zum atomaren Kraftmikroskop einfach zu handhabendes Affinitätsbiosensor-System beruht auf der mechanischen Verformung elastischer Hydrogelsonden (SCPs, engl. *soft colloidal probes*).^[254] Die Deformierung der SCPs kann mittels der lichtmikroskopischen Technik der Reflexionskontrastmikroskopie (RICM, engl. *reflection interference contrast microscopy*) detektiert werden.^[255, 256]

2.7.2 REFLEXIONSKONTRASTMIKROSKOPIE FÜR MECHANISCH VERFORMBARE HYDROGEL-SONDEN

Affinitätsbiosensor-Systeme wie mechanisch verformbare Hydrogelsonden ermöglichen eine Charakterisierung von sowohl spezifischen als auch unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Biomakromolekülen und verschiedensten Substratoberflächen.^[257-262] Dafür werden die biologischen Verbindungen kovalent an die SCPs gebunden und bewirken durch adhäsive Interaktionen mit einer festen Oberfläche eine physikalisch messbare Deformation der sphärischen Kolloide.^[256] Diese Verformung kann als ein Maß für die Stärke der Wechselwirkungen der Systeme interpretiert und mittels Techniken wie der Reflexionskontrastmikroskopie – auch als Interferenzreflexionsmikroskopie bezeichnet – in Form von Adhäsionsenergien ausgelesen werden.^[255, 256] **Abbildung 2.8** zeigt das Funktionsprinzip der SCP-Methode zur Bestimmung der Kontaktfläche eines mechanisch verformbaren Hydrogelpartikels, an dessen Oberfläche biomakromolekulare Strukturen immobilisiert sind, sowie eine schematische Darstellung der dazugehörigen interferenzmikroskopischen Aufnahmen.^[261] Hierbei sedimentiert die in Lösung vorliegende Hydrogelsonde ohne die Einwirkung äußerer Kräfte, so dass die SCP-gebundenen Biomakromoleküle mit einer Glasoberfläche wechselwirken können (vgl. **Abbildung 2.8 oben**). Die damit verbundene mechanische Verformung des elastischen Kolloids führt zu charakteristischen Oberflächenkontakten in Form konzentrischer Ringe, die mittels des inversen Mikroskops detektiert werden (vgl. **Abbildung 2.8 unten**).

Der an Hand von RICM-Aufnahmen bestimmbare Kontaktradius a des zentralen Interferenzminimums kann mit Hilfe des JKR-Modells^[263] mathematisch interpretiert werden und ermöglicht eine Berechnung der entsprechenden Adhäsionsenergie W_{JKR} [$\mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$] (**Gleichung 3**):

$$a^3 = 6\pi \cdot \frac{W_{JKR}}{4E/(1-\vartheta^2)} \cdot R^2 \quad (\text{Gleichung 3})$$

Dabei entspricht R dem Radius des SCPs und E dem Elastizitätsmodul als Maß für die Stärke des Widerstandes, den ein Material seiner Deformierung entgegensetzt. Die POISSON-Zahl ϑ definiert das Verhältnis der Quer- zur Längsverformung bei unidirektionaler Belastung. Die so ermittelten Adhäsionsenergien entsprechen einem direkten Bindungstest zwischen den sondengebundenen Biomakromolekülen und der Glasoberfläche. Im Vergleich sättigungsabhängigen Adsorptionstechniken zur Aufklärung adhäsiver Eigenschaften wie beispielsweise der Quarzkristall-Mikrowaage können mittels der SCP-Methode die multivalenten Oberflächenkontakte quantitativ wiedergegeben werden.^[261]

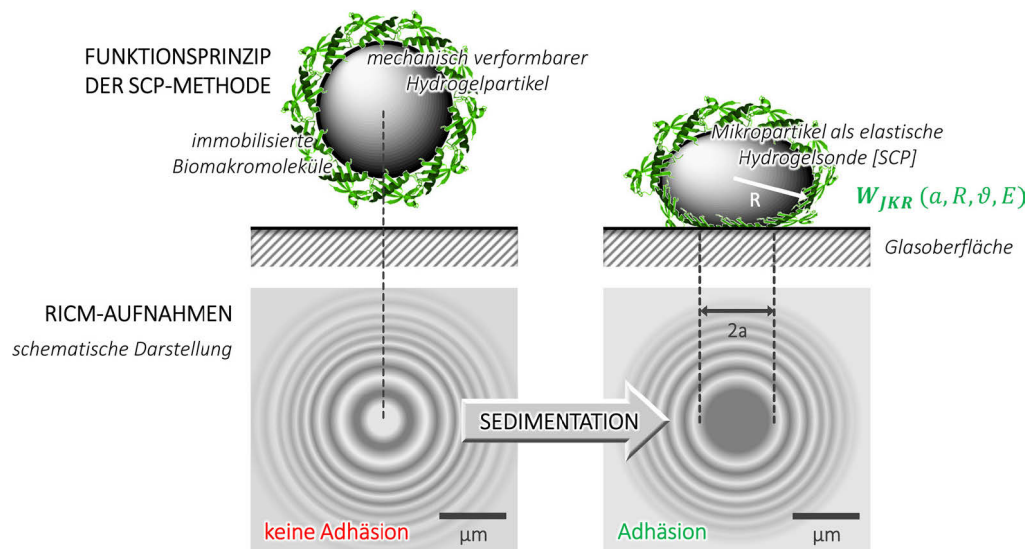


Abbildung 2.8. Funktionsprinzip der SCP-Methode zur Bestimmung der Kontaktflächen elastischer Hydrogelsonden (SCPs) mittels der Messtechnik der Reflexionskontrastmikroskopie (RICM): Durch die Sedimentation des SCPs können die an der Hydrogelsonde immobilisierten Biomakromoleküle mit der Glasoberfläche wechselwirken (**oben**). Die damit verbundene mechanische Verformung des SCPs führt zu charakteristischen Oberflächenkontakten und wird in RICM-Aufnahmen als radiales Interferenzmuster sichtbar – hier schematisch dargestellt (**unten**). Zur Berechnung der Adhäsionsenergie W_{JKR} auf Grundlage des JKR-Modells^[263] wird der Kontaktradius a aus dem zentralen Interferenzminimum ermittelt.^[261] Proteinstruktur Protegrin PDB ID: 1KWI.^[47]

Für eine erfolgreiche Anwendung des Messprinzips werden sowohl an die Sonden als auch an die Substratoberfläche bestimmte Anforderungen gestellt. Letztere sollten aus einem möglichst lichtdurchlässigen und harten Material wie beispielsweise ebenen Glasoberflächen bestehen.^[257] Der amorphe Feststoff erlaubt eine Funktionalisierung der Oberfläche, um die Interaktionen biomakromolekularer Strukturen mit verschiedenen Systemen untersuchen zu können.^[264, 265] Die Hauptkriterien für SCPs wiederum sind sehr vielfältig. Neben minimal unspezifischen Wechselwirkungen des Sondenmaterials mit der Substratoberfläche ist eine möglichst glatte Partikeloberfläche erforderlich.^[256] Darüber hinaus ist eine hohe Deformierbarkeit der sphärischen Kolloide für eine erfolgreiche Anwendung der SCP-Methode unabdingbar. In aktuellen Forschungen zur Untersuchung der adhäsiven Wechselwirkungen von Biomakromolekülen mit Substratoberflächen haben sich Poly(ethylenglycol)-basierte Hydrogelpartikel als besonders geeignet erwiesen.^[258-260, 262, 266] Die aus langkettigen PEG-Makromolekülen bestehenden Mikrosphären verfügen über eine exzellente Biokompatibilität.^[64] Weiterhin sind die neutralen und nicht-adhäsiven PEG-SCPs mit Elastizitätsmodulen unterhalb von 100 kPa hochflexibel bzw. mechanisch verformbar.^[257]

Um die SCP-Methode zur Charakterisierung biologischer Adhäsionsprozesse heranziehen zu können, ist eine kovalente Anbindung der gewählten Biomakromoleküle an dem Sondenmaterial erforderlich. Die Synthese und Modifikation von PEG-Mikropartikeln mit geeigneten funktionellen Gruppen ist relativ unproblematisch und gestattet die Immobilisierung der biologischen Verbindungen mittels etablierter Ligationsstrategien.^[257, 260] Somit besteht die Möglichkeit, elastische PEG-Hydrogelpartikel als Affinitätsbiosensor-Systeme in die quantitative Analyse enzymatisch aktivierbarer Adhäsionsdomänen zu involvieren.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Enzymatisch aktivierbare Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten

3.1.1 ENTWICKLUNG UND IDENTIFIZIERUNG GEEIGNETER SUPPRESSIONSDOMÄNEN

Das Konzept der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten wurde mittels der literaturbekannten Adhäsionsdomäne **TBP** (RKLPDAPGMHTW)^[233] für Titandioxid-Oberflächen (vgl. **Kapitel 2.6.2** Seite 22) umgesetzt. Der erste Schritt beinhaltete die Entwicklung einer praktikablen Strategie, um die adhäsiven Eigenschaften des linearen 12-meres zu unterdrücken und einen entsprechend nicht-bindenden und enzymresponsiven Biokonjugat-Vorläufer zu erhalten. Als Grundlage hierfür dienten die Erkenntnisse der Arbeitsgruppen SHIBA und MIRAU, welche die Oberflächenhaftung der Peptidsequenz mit dessen Sekundärstruktur und den geladenen Aminosäure-Seitenketten in Zusammenhang brachten.^[233, 236] Dabei konnte das *N*-terminale Motiv RKLPDA als vornehmlich für die Adsorption verantwortlicher Sequenzabschnitt identifiziert werden.^[233] Insbesondere die Aminosäuren Arginin (R¹) und Asparaginsäure (D⁵) leisteten unter neutralen pH-Bedingungen den entscheidenden Beitrag.^[236] Dementsprechend wurde der Ansatz verfolgt, die Haftungseigenschaften von **TBP** gegenüber Titandioxid-Oberflächen durch eine *N*-terminal eingeführte Suppressionsdomäne zu unterbinden (vgl. **Abbildung 3.1**).

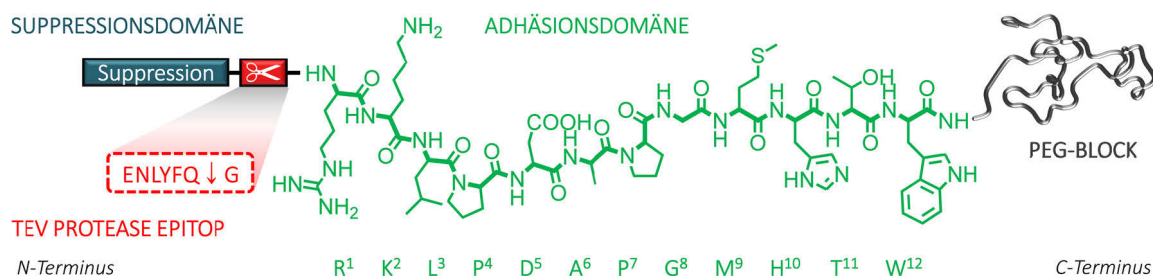


Abbildung 3.1. Prinzipieller Aufbau eines nicht-bindenden Peptid-PEG-Konjugates als Vorläufer der enzymatisch aktivierbaren Adsorption. Die *N*-terminale Suppressionsdomäne bewirkt die Unterdrückung der adhäsiven Eigenschaften des titanbindenden Peptides **TBP**. Zwischen der potentiell haftungsunterbindenden Einheit und der Adhäsionsdomäne **TBP** wird die spezifische Erkennungssequenz ENLYFQ↓G der TEV Protease eingeführt, um eine Abtrennung der Suppressionsdomäne zu ermöglichen und die Haftungseigenschaften von **TBP** zu regenerieren. Der lineare PEG-Block am C-Terminus dient der Abschirmung der Titandioxid-Oberfläche gegenüber unspezifisch adsorbierenden Proteinen.

Um die adhäsiven Eigenschaften anschließend zurückbilden zu können, wurde zwischen der potentiell haftungsunterbindenden Einheit und der Adhäsionsdomäne die spezifische Erkennungssequenz der TEV Protease integriert. Das Epitop ENLYFQ↓G^[155, 156] sollte die Abtrennung der Suppressionsdomäne durch proteolytische Spaltung der Amidbindung zwischen Glutamin und Glycin ermöglichen (vgl. **Kapitel 2.4.2** Seite 14). Im Hinblick auf eine materialwissenschaftliche Anwendung des enzymresponsiven Systems als *in situ* aktivierbare Antifouling-Beschichtung wurde die Peptidsequenz C-terminal mit einem linearen PEG-Block verbunden.

Die Unterdrückung der Oberflächenhaftung von **TBP** sollte durch Suppressionsdomänen bestehend aus anionischen oder kationischen Aminosäuren untersucht werden.^[267] Deren geladene Seitenketten sollten die Wechselwirkungen des Bindungsmotives RKLPDA mit dem Metalloxid beeinträchtigen und eine elektrostatische Abstoßung von der Oberfläche bewirken. Dabei wurde berücksichtigt, dass die starke Adsorption der Adhäsionsdomäne **TBP** nicht unabhängig von der Beschaffenheit der Titandioxid-Oberfläche betrachtet werden kann. Eine vereinfachte Annahme der Wechselwirkungen geladener Verbindungen mit dem Metalloxid beinhaltet, dass bei neutralen pH-Werten bevorzugt kationische Aminosäuren bedingt durch die negativen Gesamtladung der Oberfläche auf TiO₂ angereichert werden.^[224] Jedoch ist Lysin (K²) von **TBP** – bedingt durch die konformelle Starrheit des Peptidrückgrates sowie der ionischen Interaktionen zwischen den Seitenketten von R¹ und K² – nicht an der Adsorption des Peptides beteiligt.^[236] Gleichzeitig wechselwirkt die negativ geladene Asparaginsäure (D⁵) mit der amphoteren Metalloxid-Oberfläche (–Ti–OH₂⁺) und leistet einen entscheidenden Beitrag zur Bindung.^[233] Daher wurde für die Adhäsionsdomäne **TBP** postuliert, dass die Einführung kationischer Aminosäuren nicht zwingend die Oberflächenhaftung von **TBP** verstärken muss, sondern vielmehr die Sekundärstruktur des Peptides für die Adsorption entscheidend ist. Gleichmaßen kann keine generelle Aussage darüber getroffen werden, dass anionische Aminosäuren zu einer verstärkten Bindung führen und nicht ebenso eine Abstoßung von der Oberfläche bewirken könnten.

Darüber hinaus wurde der haftungsunterbindende Effekt einer ungeladenen und sterisch anspruchsvollen Suppressionsdomäne in Betracht gezogen. Durch Verknüpfung der ε-Aminofunktion eines Lysins mit einer 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]-Einheit wurde die positive Ladung der Seitenkette neutralisiert. Die resultierende Aminosäure **K^εOEG** wurde als Fmoc-geschütztes Derivat synthetisiert, um dieses direkt während der festphasengebundenen Peptidsynthese einführen zu können (vgl. **Kapitel 5.4.1** Seite 116).^[267] Die Modifikation könnte aufgrund sterischer Effekte mit dem N-terminalen Bindungsmotiv RKLPDA interagieren und dadurch weitere Wechselwirkungen von **TBP** mit der Titandioxid-Oberfläche unterbinden.

Aus den theoretischen Vorüberlegungen zur der Unterdrückung der adhäsiven Eigenschaften von **TBP** hervorgehend wurden sechs potentiell nicht-bindende Peptid-PEG-Konjugate **S1-PEG** bis **S6-PEG** entworfen. Dafür wurden die proteinogenen Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure sowie das synthetische Derivat **K^εOEG** als einfache und zweifache Modifikation integriert, um sowohl den Einfluss verschiedener Ladungszustände als auch sterischer Effekte auf die Oberflächenhaftung von **TBP** zu untersuchen. Die erarbeiteten Suppressionsdomänen sowie die Nettoladungen bei pH 7.0 und isoelektrischen Punkte der Biokonjugate **S1-PEG** bis **S6-PEG** sind in **Tabelle 3.1** angegeben. Die funktionsunterdrückenden Segmente wurden zusätzlich

N-terminal acetyliert, um einen möglichen Einfluss der geladenen Aminosäure-Seitenketten auf das Adsorptionsverhalten auszuschließen. Zusätzlich wurde das adhäsive Peptid-Polymer-Konjugat **G-TBP-PEG^{ENZ}** als chemisch analoge Variante **G-TBP-PEG^{CHEM}** synthetisiert, welches aus der enzymatischen Prozessierung eines nicht-bindenden Vorläufers hervorgehen würde. Durch dieses sollte die Effektivität der konzipierten Suppressionsdomänen hinsichtlich der Haftungsunterbindung der Adhäsionsdomäne **TBP** bewertet werden können. Darüber hinaus erlaubt die synthetische Referenz eine Einschätzung der Leistungsfähigkeit der enzymatisch aktivierbaren Adsorption. Die Darstellung der Peptid-PEG-Konjugate erfolgte auf Basis der inversen Konjugationsstrategie (vgl. **Kapitel 2.2.3** Seite 7) an einem TentaGel® PAP Harz (engl. *PEG-attached peptide resin*), wobei die entsprechenden Sequenzen mittels festphasengebundener Peptidsynthese an einem linearen PEG-Block ($M_{n,PEG} = 3.0 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) aufgebaut wurden.^[88] Nach Abspaltung der Biokonjugate vom polymeren Träger und vollständiger Entschützung der Aminosäure-Seitenketten durch Behandlung mit TFA/TMSBr/Thioanisol (94:1:5, v/v/v) konnten die Hybridmakromoleküle isoliert werden. Die Charakterisierung erfolgte durch die massenspektrometrischen und infrarotspektroskopischen Analysemethoden MALDI-ToF-MS (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) bzw. FT-IR (engl. *fourier-transform infrared spectroscopy*).

Tabelle 3.1. Potentiell nicht-bindende Peptid-PEG-Konjugate **S1-PEG** bis **S6-PEG** mit verschiedenen Suppressionsdomänen und das chemisch dargestellte Analogon **G-TBP-PEG^{CHEM}** der enzymatischen Aktivierung ohne entsprechende Domäne unter Angabe der Nettoladungen bei pH 7.0 und der isoelektrischen Punkte.

Peptid-PEG-Konjugat	Suppressionsdomäne	Nettoladung ^a (pH 7.0)	IEP ^a
G-TBP-PEG^{CHEM}	–	+ 1.83	11.20
S1-PEG	Ac-KG	+ 1.14	19.83
S2-PEG	Ac-(KG) ₂	+ 2.14	10.20
S3-PEG	Ac-EG	– 0.85	15.66
S4-PEG	Ac-(EG) ₂	– 1.85	15.02
S5-PEG	Ac-K ^{EOEG} G	+ 0.14	17.92
S6-PEG	Ac-(K ^{EOEG} G) ₂	+ 0.14	17.92

^a Nettoladungen und IEPs wurden mittels der Software SEDNTERP berechnet.^[268]

Das Adsorptions- und Desorptionsverhalten der potentiell nicht-bindenden Biokonjugate **S1-PEG** bis **S6-PEG** auf Titandioxid-Oberflächen wurde mittels QCM-D im Vergleich zu der Oberflächenhaftung der synthetischen Referenz **G-TBP-PEG^{CHEM}** analysiert. Die dabei angestrebte Identifizierung geeigneter Suppressionsdomänen für die Adhäsionsdomäne **TBP** diene als Vorarbeit für die enzymatisch aktivierbare Adsorption von Peptid-Polymer-Konjugaten, um proteinresistente Beschichtungen zu erzeugen. Die Untersuchungen erfolgten unter neutralen Bedingungen in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0), um einen Vergleichbarkeit mit den NMR-spektroskopischen Analysen von MIRAUS zu gewährleisten.^[236] Die simultane Aufzeichnung von Frequenz- und Dissipationsänderungen ermöglichte die Beschreibung der Materialanreicherung auf der Oberfläche sowie der viskoelastischen Eigenschaften der gebildeten

Beschichtungen. Die hier und in den nachfolgenden Kapiteln dargelegten Messdaten wurden an Hand der dritten Frequenz- und Dissipationsobertöne $\Delta f_{n=3}/3$ bzw. $\Delta D_{n=3}$ interpretiert. Die QCM-D-Messung des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** auf TiO₂ zeigte nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) einen starken Frequenzabfall auf – 25 Hz innerhalb der ersten 3 Minuten (vgl. **Abbildung 3.2a**). Während der Inkubation über 3.5 Stunden konnte im Gleichgewichtszustand zwischen adsorbierenden und desorbierenden Molekülen eine Frequenzverschiebung von – 35 Hz verzeichnet werden. Die gebildete Beschichtung wurde im nachfolgenden Spülschritt mit Phosphat-Puffer nur zu einem geringen Anteil von der Oberfläche abgelöst.^[267] Aufgrund der direkten Proportionalität zwischen Frequenz- und Massenänderungen konnte der Massenverlust des adsorbierten Materials auf etwa 20 % beziffert werden (vgl. **Kapitel 2.7.1** Seite 24).^[243]

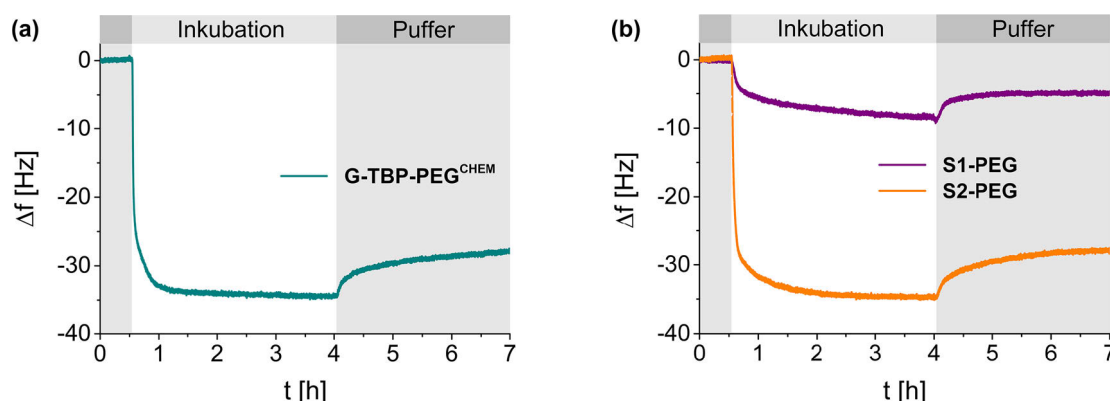


Abbildung 3.2. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** ohne Suppressionsdomäne (a) und der kationisch modifizierten Peptid-PEG-Konjugate **S1-PEG** und **S2-PEG** (b). Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Biokonjugat-Lösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Die Inkubation der enzymresponsiven Biokonjugate **S1-PEG** bis **S6-PEG** führte zu sehr unterschiedlich verlaufenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen in Abhängigkeit von der eingeführten Suppressionsdomäne. Die kationisch modifizierten Varianten **S1-PEG** und **S2-PEG** erlangten während der Inkubationsphase Frequenzverschiebungen von bis zu – 8 Hz bzw. – 35 Hz, wobei insbesondere das zweifach positiv geladene Biokonjugat **S2-PEG** schnell auf der Oberfläche akkumuliert wurde (vgl. **Abbildung 3.2b**).^[267] Mit etwa 20 % Materialverlust nach der Inkubationsphase war die Reversibilität der Beschichtung von **S2-PEG** mit dem Desorptionsverhalten des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** identisch. Bedingt durch die Lysin-Seitenketten der Suppressionsdomäne Ac-(KG)₂ von **S2-PEG** waren Nettoladungen und IEPs der beiden Biokonjugate mit Werten im Bereich von + 2 bzw. + 10 – 11 ebenfalls vergleichbar. Die Adsorption von **TBP** auf Titandioxid-Oberflächen konnte in der linearen Anordnung von Suppressions- und Adhäsionsdomäne demnach nicht durch einfach bzw. mehrfach integrierte Aminosäuren mit kationischen Seitenketten unterdrückt werden.

Im Gegensatz dazu führten die negativ geladenen Suppressionsdomänen Ac-EG und Ac-(EG)₂ der Peptid-PEG-Konjugate **S3-PEG** bzw. **S4-PEG** dazu, dass die Oberflächenhaftung der Adhäsionsdomäne **TBP** vollständig aufgehoben wurde. Die Inkubation der Metalloxid-Oberfläche mit den beiden Biokonjugaten bewirkte nur geringe Frequenzänderungen bis maximal

– 2 Hz für **S3-PEG** und – 1 Hz für **S4-PEG** (vgl. **Abbildung 3.3a**). Der Verlauf der Adsorptionsisothermen zeigte, dass sowohl **S3-PEG** als auch **S4-PEG** nur minimal hafteten und die adsorbierten Moleküle im anschließenden Spülschritt wieder vollständig von der Oberfläche entfernt wurden.^[267] Die Glutaminsäure-Seitenketten der Suppressionsdomänen führten zu negativen Nettoladungen von – 0.85 bzw. – 1.85. Dies war vermutlich der entscheidende Einfluss auf das Adsorptionsverhalten **S3-PEG** und **S4-PEG**, weshalb beide Biokonjugate von der negativen Oberflächenladung von TiO₂ elektrostatisch abgestoßen werden konnten (IEP = 4.7 – 6.2).^[223]

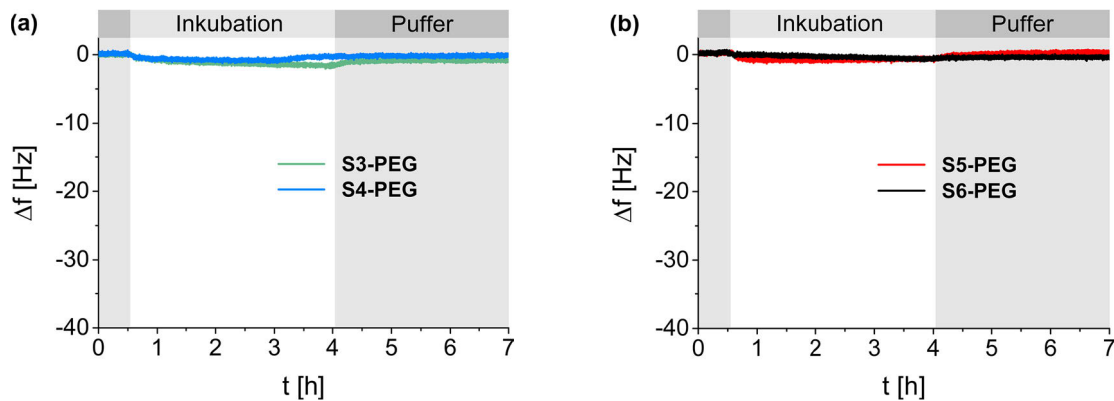


Abbildung 3.3. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der anionisch modifizierten Peptid-PEG-Konjugate **S3-PEG** und **S4-PEG** (a) sowie der mit dem ungeladenen Lysin-Derivat $K^{\epsilon OEG}$ modifizierten Strukturen **S5-PEG** und **S6-PEG** (b). Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Biokonjugat-Lösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Durch die Modifikation mit dem ungeladenen Lysin-Derivat $K^{\epsilon OEG}$ in Form der Peptid-PEG-Konjugate **S5-PEG** und **S6-PEG** konnte die Oberflächenhaftung der Adhäsionsdomäne **TBP** ebenfalls entscheidend reduziert werden. Wie schon die zuvor beschriebenen anionischen Biokonjugate **S3-PEG** und **S4-PEG**, adsorbierten die neutralen Systeme vollständig reversibel mit geringen Frequenzverschiebungen von maximal – 1 Hz während der Inkubationsphase (vgl. **Abbildung 3.3b**).^[267] Hierbei könnten sowohl die neutralen Nettoladungen der beiden Biokonjugate als auch der sterische Anspruch von $K^{\epsilon OEG}$ als Ursache für die verminderten Wechselwirkungen mit der Oberfläche betrachtet werden.

Die ermittelten anionischen und neutralen Suppressionsdomänen der nicht-bindenden Biokonjugate **S3-PEG** bis **S6-PEG** eröffneten die Möglichkeit, durch enzymatische Prozessierung die Haftungseigenschaften der polymergebundenen Adhäsionsdomäne **TBP** zu regenerieren und dadurch bioinerte Beschichtungen für Titandioxid-Oberflächen zu erzeugen. Folglich sollte die katalytische Effizienz der TEV Protease gegenüber einem geeigneten enzymresponsiven Substrat zur Abtrennung der entsprechenden Suppressionsdomäne evaluiert werden.

3.1.2 ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG NICHT-BINDENDER PEPTID-PEG-KONJUGATE

3.1.2.1 Entwicklung eines Aktivierungsprotokolls

Die Identifizierung geeigneter Suppressionsdomänen zur Unterdrückung der adhäsiven Eigenschaften von **TBP** durch QCM-D-Experimente ermöglichte enzymkinetische Untersu-

chungen zur Aktivierung der oberflächenspezifischen Adsorption. Hierfür standen die vier Peptid-PEG-Konjugate **S3-PEG** bis **S6-PEG** zur Verfügung, welche nur minimal und vollständig reversibel auf TiO₂ hafteten. Für die nachfolgenden Aktivierungsexperimente wurde das nicht-bindende Biokonjugat **S4-PEG** favorisiert, dessen Suppressionsdomäne zwei Glutaminsäuren beinhaltet. Dieses zeigte im Vergleich zu der einfach negativ geladenen Variante **S3-PEG** eine leicht verminderte Oberflächenhaftung während der Inkubationsphase (vgl. **Abbildung 3.3a** Seite 33). Obgleich durch die neutrale Modifikation **K^{εOEG}** der Peptid-PEG-Konjugate **S5-PEG** und **S6-PEG** die adhäsiven Eigenschaften von **TBP** ebenfalls erfolgreich unterdrückt werden konnten, wurde aufgrund materialwissenschaftlicher Aspekte eine synthetisch einfacher zugängliche Variante für die Aktivierungsstudien bevorzugt.

Für die enzymatische Aktivierung von **S4-PEG** wurde eine kommerziell verfügbare Variante der rekombinant exprimierbaren TEV Protease gewählt (*Roboklon*, Berlin, Deutschland). Um die bestmöglichen Bedingungen hinsichtlich der enzymatischen Hydrolyse des Biokonjugates zu erzielen, wurde zunächst an Hand der Angaben des Anbieters ein modifiziertes Protokoll erarbeitet.^[267] Die Originalvorschrift beschreibt die Umsetzung von 20 µg eines 35 kDa Fusionsproteins zu 95 % unter Verwendung von 9 Units Enzym innerhalb 1 Stunde bei einer Temperatur von 30 °C (vgl. **Tabelle 3.2**). Dabei entspricht 1 Unit der viralen Cysteinprotease der Enzymmenge, um 3 µg der Testsubstanz zu > 85 % proteolytisch zu spalten.^[269] Diese katalytische Aktivität wird durch die leicht basischen und reduktiven Bedingungen eines zusätzlich bereitgestellten Protease-Puffers bestehend aus 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl und 14 mM 2-Mercaptoethanol (2ME) gewährleistet.

Tabelle 3.2. Modifiziertes Protokoll für die enzymatische Aktivierung des nicht-bindenden Substrates **S4-PEG** durch die TEV Protease im Vergleich zu der Herstellervorschrift für ein 35 kDa Fusionsprotein.^[267]

		Herstellervorschrift	Modifiziertes Protokoll
		Fusionsprotein	Biokonjugat S4-PEG
Proteasesubstrat		20 µg [35000 g·mol ⁻¹]	20 µg [5669.49 g·mol ⁻¹]
Stoffmenge		0.57 nmol	3.53 nmol
TEV Protease	spezifische Aktivität	8 Units·µL ⁻¹	5 Units·µL ⁻¹
	Konzentration	9 Units: 1.13 µL	56 Units: 11.1 µL
10× TEV Puffer ^a		10.0 µL	61.7 µL
Gesamtvolumen		100.0 µL	617.3 µL

^a Eine Verdünnung von 1:10 (v/v) des bereitgestellten 10× TEV Puffers ergibt den Protease-Puffer mit 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl und 14 mM 2-Mercaptoethanol (2ME). Weitere Bedingungen: 1 Stunde, 30 °C.

Entsprechend der Herstellervorschrift vorgenommene stöchiometrische Berechnungen ergaben, dass 56 Units TEV Protease benötigt werden, um 20 µg **S4-PEG** unter den vorgegebenen Bedingungen umsetzen zu können (vgl. **Tabelle 3.2**).^[267] Darüber hinaus wurde berücksichtigt, dass der Hersteller das Enzym in einer gepufferten Glycerol-Lösung aufbewahrt, um dessen Lagerfähigkeit zu verbessern. Auch wenn Proteasen im Allgemeinen den Hilfsstoff bis zu einem gewissen Anteil tolerieren, kann ein zu hoher Anteil in der Reaktionslösung zu einer Verminderung der katalytischen Aktivität führen.^[270] Daher wurden die Konzentrations-

verhältnisse von TEV Protease und Protease-Puffer für das modifizierte Protokoll übernommen und die einzusetzende Enzymmenge entsprechend der spezifischen Aktivität der Enzympräparation von $5 \text{ Units} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ angepasst.

In der Regel wird die in der vorliegenden Arbeit verwendete TEV Protease zur Umsetzung geringer Substratmengen herangezogen. Beispielweise nutzen biochemisch ausgerichtete Fachbereiche das Enzym zur schnellen Abtrennung von Transporterdomänen oder Affinitätstags nach der Expressierung rekombinanter Proteine. Jedoch erfüllen Proteolysereaktionen im Mikrogramm-Maßstab die Ansprüche materialwissenschaftlicher Anwendungen nur ungenügend. Folglich wurde angestrebt, möglichst hohe Konzentrationen des Substrates **S4-PEG** mit einem geringen Materialaufwand an TEV Protease zu prozessieren. Dies erforderte umfassende Untersuchungen, um die Effizienz der enzymatischen Aktivierung größerer Mengen des Peptid-PEG-Konjugates quantitativ ermitteln zu können.

3.1.2.2 Reinheitsbestimmung von Peptid-PEG-Konjugaten

Um eine zuverlässige Aussage hinsichtlich der proteolytischen Umsetzung von **S4-PEG** treffen zu können, war eine Bewertung der Substratreinheit erforderlich. Dabei wurde berücksichtigt, dass die der Darstellung des Peptid-PEG-Konjugates zugrundeliegende inverse Konjugationsstrategie den Limitierungen der festphasengebundenen Peptidsynthese unterliegt. Auch wenn die Synthese kurzkettiger Sequenzen in der Regel unproblematisch verläuft, können bei Peptiden bestehend aus 20 – 30 Aminosäuren bereits vermehrt Abbruch- oder Auslassungssequenzen auftreten.^[271] Die Peptidkomponente des nicht-bindenden Biokonjugates **S4-PEG** wurde durch die Verknüpfung von 23 Aminosäuren mit der immobilisierten Polymereinheit verbunden. Dementsprechend war es erforderlich, nach der Abspaltung des Aktivierungssubstrates vom festen Trägermaterial mögliche fehlerhafte Segmente zu ermitteln.

Die Reinheit synthetischer Peptidsequenzen wird routinemäßig mittels chromatographischer Trennmethode wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an einem Umkehrphasenmaterial (RP-HPLC, engl. *reversed-phase high performance liquid chromatography*) untersucht.^[272] Bei Peptid-Polymer-Konjugaten dagegen ist eine hochauflösende Auftrennung der eigentlichen Zielstruktur und die Identifizierung möglicher fehlerhafter Segmente nur schwierig zu realisieren. Die Molmassenverteilung der Polymereinheit führt dabei unvermeidlich zu einer Verbreiterung und Überlagerung der UV-Vis-Signale (engl. *ultraviolet-visible*). Chemische Methoden zur Sequenzierung von Proteinen^[273] bieten eine alternative Herangehensweise für eine einfache Reinheitsbestimmung von Peptid-PEG-Konjugaten. Durch aminosäurespezifisch spaltende Reagenzien können definierte Peptidfragmente von der PEG-Einheit abgetrennt und mittels chromatographischer Methoden quantitativ analysiert werden. Eine säurekatalysierte Behandlung mit Cyanogenbromid (CNBr)^[274] im Überschuss beispielsweise bewirkt die Spaltung der Amidbindung C-terminal von Methionin. Bei **S4-PEG** befindet sich die schwefelhaltige Aminosäure entsprechend der Richtung der festphasengebundenen Peptidsynthese vom C- zum N-Terminus an vierter Position. Das Auftreten potentieller Fehlsequenzen während der ersten vier Aminosäuren kann als minimal eingestuft werden, da Kupplungszyklen kurzer Peptidketten üblicherweise mit einer Effizienz von über 99 % verlaufen.^[275] Die CNBr-Spaltung

von **S4-PEG** führte zu *N*-terminalen Peptidfragmenten mit Homoserin-Lacton- und Homoserin-Resten am C-Terminus sowie einem C-terminalen Peptid-PEG-Fragment (vgl. **Kapitel 5.3.2** Seite 111). Die Spaltprodukte wurde an einer Umkehrphase mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC, engl. *ultra-high performance liquid chromatography*) gekoppelt mit einem Massenspektrometer (ESI-MS, engl. *electrospray ionization mass spectrometry*) analysiert. Die Zuordnung der aufgetrennten Signale zu den entstandenen Peptidfragmenten und die quantitative Auswertung der entsprechenden Signalflächen ergab eine Reinheit von mindestens 87 % und ist in **Kapitel 5.5.9** (vgl. Seite 126) detailliert beschrieben.^[267]

Durch die Analyse konnte nachgewiesen werden, dass unerwünschte Abbruchsequenzen ausschließlich nach der 17. Aminosäure der Peptidkomponente des Substrates **S4-PEG** im *N*-terminalen Bereich der TEV Protease Erkennungssequenz auftraten. Auch wenn eine 13 %ige Verunreinigung als nicht ideal angesehen werden könnte, wurde vor dem Hintergrund materialwissenschaftlicher Anwendungen angestrebt, aufwendige und kostenintensive Reinigungsschritte zu vermeiden. Die charakteristische Polydispersität der PEG-Komponente stellte dabei den limitierenden Faktor dar. Standardmäßig für Peptide verwendete semipräparative Trennverfahren würden umfassende Optimierungen hinsichtlich des Säulenmaterials, der Zusammensetzung der mobilen Phase und des Laufmittelgradienten erfordern. Jedoch ist im Fall des enzymresponsiven Biokonjugates **S4-PEG** zu betonen, dass die fehlerhaften Segmente ausschließlich nach der Adhäsionsdomäne **TBP** einsetzten. Im Hinblick auf das Konzept der enzymatisch aktivierbaren Adsorption ist die eigentliche Funktion des Peptid-PEG-Konjugates demnach nicht eingeschränkt. Dieser Sachverhalt erlaubte es, **S4-PEG** ohne weitere Aufreinigung proteolytisch zu prozessieren und die Substratumsetzung unter Berücksichtigung der 87 %igen Reinheit quantitativ zu bestimmen.

3.1.2.3 Effizienz der Aktivierung in Abhängigkeit von Substrat- und Enzymkonzentration

Die Quantifizierung des Umsatzes von **S4-PEG** in Abhängigkeit von Substrat- und Enzymkonzentration erfolgte mittels analytischer RP-HPLC-Messungen unter Verwendung eines geeigneten Gradienten. Diese ermöglichten die chromatographische Trennung der proteolytisch abgespaltenen Suppressionsdomäne (**IF**, engl. *interfering domain*) in Form der Peptidsequenz Ac-(EG)₂-ENLYFQ (**IF**^{ENZ}) von dem Edukt **S4-PEG** sowie dem entstehenden adhäsiven Peptid-PEG-Konjugat **G-TBP-PEG**^{ENZ}.^[267] Für die enzymatischen Aktivierung von 1.00 mg des nicht-bindenden Substrates **S4-PEG** mittels 56 Units TEV Protease (vgl. **Tabelle 3.2** Seite 34) ist in **Abbildung 3.4a** exemplarisch eine Serie von HPLC-Chromatogrammen dargestellt, welche nach definierten Proteolysezeiten bei einer Wellenlänge von 210 nm aufgezeichnet wurden. Diese zeigten die Entstehung der Suppressionsdomäne **IF**^{ENZ} als ein isoliertes UV-Vis-Signal mit zunehmender Intensität bei Retentionszeiten von 5.6 – 5.8 Minuten, während die Biokonjugate **G-TBP-PEG**^{ENZ} und **S4-PEG** zu einem späteren Zeitpunkt nur geringfügig zueinander versetzt eluiert wurden. Die Zuordnung der detektierten Signale zu den entsprechenden Spaltprodukten erfolgte an Hand von RP-HPLC-Messungen der synthetischen Analoga **IF**^{CHEM} bzw. **G-TBP-PEG**^{CHEM}. Die überlagerten UV-Vis-Signale bei einer Retentionszeit von 1 – 2 Minuten konnten durch Referenzmessungen dem Protease-Puffer zugeordnet werden.

Zur Bestätigung der gewünschten Substratumsetzung des enzymresponsiven **S4-PEG** wurden massenspektrometrische Analysemethoden herangezogen. Das nach 16 Stunden Aktivierung aufgenommene MALDI-ToF-MS-Spektrum zeigt die Bildung der proteolytisch abgetrennten Suppressionsdomäne **IF4^{ENZ}** als ein intensives Massensignal bei m/z 1251.0 (*ber.* m/z 1250.2) in Form des Addukt-Ions $[M+Na]^+$ (vgl. **Abbildung 3.4b**).^[267]

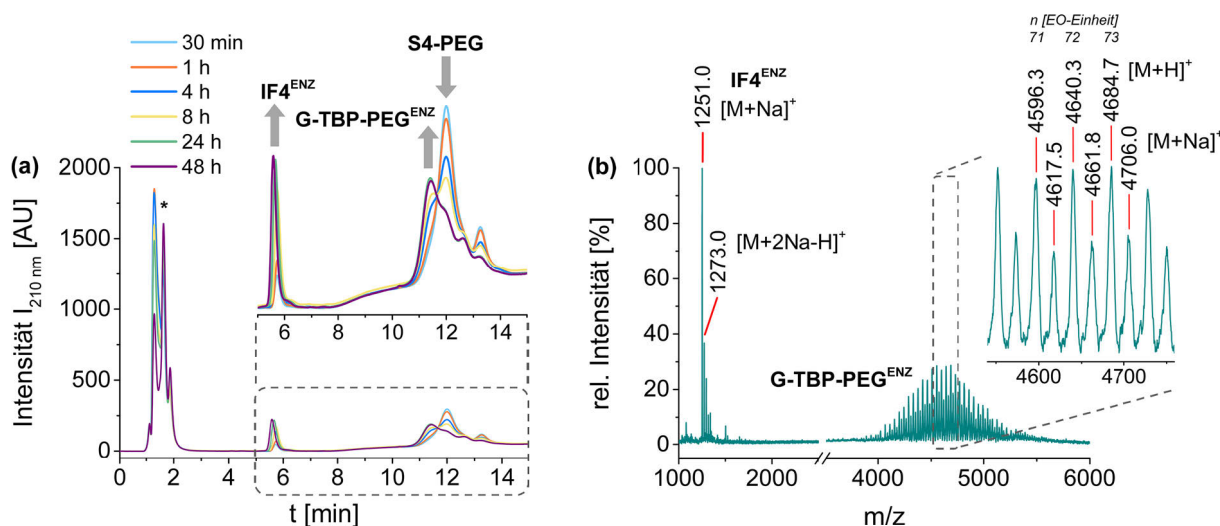


Abbildung 3.4. Quantitative und qualitative Analyse der enzymatischen Aktivierung von **S4-PEG** unter Bildung des Binders **G-TBP-PEG^{ENZ}** sowie der abgespaltenen Suppressionsdomäne Ac-(EG)₂-ENLYFQ (**IF4^{ENZ}**): Eine Serie von RP-HPLC-Chromatogrammen zeigt die zunehmende Intensität des isolierten UV-Vis-Signals der proteolytisch abgetrennten Suppressionsdomäne **IF4^{ENZ}** in Abhängigkeit der Proteolysezeit (a). Gradient RP-HPLC: 0.0 – 2.0 min: 20 %, 2.0 – 15.0 min: 20 – 65 % Acetonitril in H₂O (0.1 % HCOOH, v/v/v), 210 nm. * Überlagerte UV-Vis-Signale des Protease-Puffers und Iodacetamid. Bedingungen Proteolyse: 1.00 mg **S4-PEG**, 28 Units TEV Protease, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 30 °C. Inhibierung: 10 mM Iodacetamid. Das MALDI-ToF-MS-Spektrum nach 16 Stunden Proteolyse zeigt das Addukt-Ion $[M+Na]^+$ der Suppressionsdomäne **IF4^{ENZ}** bei m/z 1251.0 sowie die Molmassenverteilung des Biokonjugates **G-TBP-PEG^{ENZ}** mit Massensignalen in Intervallen $\Delta M = 44\text{ m/z}$, wobei die maximale Signalintensität bei m/z 4684.7 dem Addukt-Ion $[M+H]^+$ ($n = 73$) entspricht (b).

Gleichermaßen konnte die Entstehung der adhäsiven Biokonjugat-Struktur **G-TBP-PEG^{ENZ}** qualitativ nachgewiesen werden. Die Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten des Polymer-Blocks bewirkten die charakteristische Molmassenverteilung einer PEGylierten Peptidsequenz mit Massensignalen in Intervallen von $\Delta M = 44\text{ m/z}$. Die maximale Signalintensität bei m/z 4684.7 mit einer Abweichung von unter 0.1 %^[276] im Vergleich zum theoretischen Wert *ber.* m/z 4681.5 entspricht dabei dem Addukt-Ion $[M+H]^+$ ($n = 73$) des Biokonjugates. Eine detaillierte Zuordnung dieser und weiterer Massensignale kann für beide Spezies **Kapitel 5.6.1.2** (vgl. Seite 141) entnommen werden. Folglich wurde durch die TEV Protease die Peptidbindung der Erkennungssequenz ENLYFQ↓G spezifisch zwischen den Aminosäuren Glutamin und Glycin unter Bildung von **G-TBP-PEG^{ENZ}** gespalten. Darüber hinaus konnte in massenspektrometrischen Analysen nach einer Aktivierungszeit von 16 Stunden das Edukt **S4-PEG** nicht mehr nachgewiesen werden. Damit wurde eine weitere Bedingung erfüllt, das Konzept der enzymatisch aktivierbaren Adsorption am Beispiel des nicht-bindenden Substrates erfolgreich realisieren zu können. Folglich konnten die angestrebten quantitativen Untersuchungen zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit der viralen Cysteinprotease gezielt fortgeführt werden.

Die Zunahme des UV-Vis-Signals der Suppressionsdomäne **IF4^{ENZ}** (vgl. **Abbildung 3.4a**) über die Zeit ermöglichte eine indirekte Quantifizierung des Substratumsatzes bedingt durch den linearen Zusammenhang zwischen Signalfläche und Konzentration. Dabei konnte an Hand einer aufgenommenen Kalibrierungsreihe für das synthetisch dargestellte **IF4^{CHEM}** auf den Verbrauch von **S4-PEG** geschlossen und die Menge an gebildetem adhäsivem Biokonjugat **G-TBP-PEG^{ENZ}** bestimmt werden. Um die Substratumsetzung von **S4-PEG** zu einem definierten Zeitpunkt ermitteln zu können, wurden der Aktivierungslösung entsprechende Aliquote entnommen und die katalytische Aktivität der TEV Protease durch Zugabe einer äquivolumer Menge einer wässrigen 10 mM Iodacetamid-Lösung inhibiert.^[168, 277] Die inhibitorische Wirkung wurde belegt, indem das Alkylierungsreagenz in einem separaten Testansatz vor dem Enzym hinzugefügt wurde. Mittels analytischer RP-HPLC-Messungen konnte nach 4 Stunden keine Produktbildung nachgewiesen werden (vgl. **Kapitel 5.6.1.1** Seite 140). Somit war es möglich, die Effizienz der enzymatischen Aktivierung in Abhängigkeit der Proteolysezeit zu untersuchen. Hierfür wurden verschiedene Eduktmengen zwischen 0.50 mg und 1.50 mg **S4-PEG** gemäß den Konzentrationsverhältnissen des modifizierten Herstellerprotokolls (vgl. **Tabelle 3.2** Seite 34) mit 56 Units TEV Protease prozessiert. In **Tabelle 3.3a** sind die nach 4, 8, 24 und 48 Stunden ermittelte Umsatzraten unter Berücksichtigung der Reinheit des Substrates **S4-PEG** als einfach bestimmte Werte angegeben (vgl. **Kapitel 5.6.1** Seite 140).^[267] Die festgelegten Parameter von Substratkonzentration und Reaktionszeit dienten in erster Linie dazu, einen Überblick hinsichtlich der Aktivierung hoher Mengen des Biokonjugates zu erhalten. Für jede der eingesetzten Mengen an **S4-PEG** konnten nach 24 Stunden sehr hohe Umsatzraten zwischen 85 % und 90 % erzielt werden, welche in den nachfolgenden 24 Stunden nicht weiter bzw. nur noch minimal anstiegen. Insbesondere bei der enzymatischen Aktivierung von 0.50 mg **S4-PEG** stagnierte der Substratumsatz bereits nach 4 Stunden bei 90 %. Die geringere Produktbildung von 87 % nach einer Proteolysezeit von 8 Stunden konnte auf die 3 %ige Messunsicherheit der HPLC-Anlage zurückgeführt werden, welche im Zusammenhang mit den enzymkinetischen Untersuchungen ermittelt wurde und im nachfolgenden **Kapitel 3.1.2.4** (vgl. Seite 41) beschrieben ist.

Höhere Substratkonzentrationen zwischen 1.00 mg und 1.50 mg **S4-PEG** dagegen ergaben, dass die maximalen Umsatzraten innerhalb der ersten 8 Stunden nicht erreicht waren und in den folgenden 16 Stunden noch bis zu 23 % mehr des nicht-bindenden Peptid-PEG-Konjugates enzymatisch gespalten wurde. An dieser Stelle ist zu vermerken, dass die Verwendung größerer Mengen an **S4-PEG** – wie es ursprünglich in der Originalvorschrift vorgesehen war – die Geschwindigkeit der Proteolysereaktion erwartungsgemäß herabsetzte. Im Hinblick auf materialwissenschaftliche Anwendungen wurde jedoch die Prozessierung hoher Substratmengen unter Verwendung möglichst geringer Enzymkonzentrationen angestrebt. Die bisher erzielten Umsatzraten von > 85 % auch bei höheren Konzentrationen **S4-PEG** legten die Vermutung nahe, dass die Leistungsfähigkeit der viralen Cysteinprotease noch nicht vollständig erreicht war. Dementsprechend wurde die bisher eingesetzte Enzymkonzentration von 56 Units auf 28 Units halbiert und der Umsatz von Substratmengen zwischen 0.50 mg und 1.50 mg **S4-PEG** erneut in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (vgl. **Tabelle 3.3b**). Auch hier zeigte sich, dass der Großteil der Substratmengen nach 24 Stunden umgesetzt war und in den nachfolgenden 24 Stunden nur noch eine minimale Steigerung um maximal 5 % verzeichnet

werden konnte. Der 3 %ige Abfall hinsichtlich der Produktbildung zwischen den Messpunkten bei 24 und 48 Stunden bei der Umsetzung von 0.75 mg Biokonjugat wurde wie schon zuvor bei dem Ansatz 0.50 mg **S4-PEG**/56 Units TEV Protease auf die Messunsicherheit des Gerätes zurückgeführt. Die Verwendung der verschiedenen Enzymkonzentrationen offenbarte jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Effizienz der proteolytischen Spaltung des nicht-bindenden Peptid-PEG-Konjugates. Bei der Prozessierung mit 28 Units TEV Protease ergab sich eine deutliche Abhängigkeit der Umsatzraten von der eingesetzten Substratmenge. Während 0.50 mg **S4-PEG** innerhalb von 24 Stunden noch bis zu 84 % proteolytisch gespalten wurden, konnte für 1.50 mg Substrat lediglich ein Umsatz von maximal 51 % verzeichnet werden.

Tabelle 3.3. Überblick hinsichtlich der mittels analytischer RP-HPLC bestimmten Effizienz der enzymatischen Aktivierung von **S4-PEG** in Abhängigkeit von Substratkonzentration, Proteolysezeitraum und Enzymmenge: 56 Units (a) und 28 Units (b) TEV Protease.^[267]

(a)	S4-PEG [56 Units]	4 h	8 h	24 h	48 h	(b)	S4-PEG [28 Units]	4 h	8 h	24 h	48 h
	0.50 mg	90 %	87 %	90 %	90 %		0.50 mg	56 %	76 %	84 %	87 %
	0.75 mg	71 %	83 %	88 %	88 %		0.75 mg	50 %	64 %	78 %	75 %
	1.00 mg	67 %	81 %	87 %	87 %		1.00 mg	45 %	58 %	75 %	77 %
	1.25 mg	63 %	75 %	86 %	88 %		1.25 mg	40 %	51 %	64 %	69 %
	1.50 mg	62 %	76 %	85 %	87 %		1.50 mg	34 %	42 %	51 %	54 %

Gradient RP-HPLC: 0.0 – 2.0 min: 20 %, 2.0 – 15.0 min: 20 – 65 % Acetonitril in H₂O (0.1% HCOOH, v/v/v), 210 nm. Bedingungen Proteolyse: 0.50 – 1.50 mg **S4-PEG**, 56 bzw. 28 Units TEV Protease, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 30 °C. Inhibierung: 10 mM Iodacetamid.

Die Aktivierung von 1.00 mg **S4-PEG** dagegen offerierte mit 75 % einen hohen Substratumsatz verglichen mit dem geringen Materialaufwand von 28 Units TEV Protease. Gemäß Abschätzungen von Coomassie-gefärbten Proteingelen entspricht 1 Unit der viralen Cysteinprotease ungefähr 50 – 100 ng Protein.^[278] Somit konnte unter Verwendung von nur 1.4 – 2.8 µg Enzym die 50fache Menge an Substrat im Vergleich zur Originalvorschrift prozessiert und als optimales Ergebnis hinsichtlich der enzymatischen Aktivierung hoher Mengen des nicht-bindenden Vorläufers **S4-PEG** eingestuft werden. Weshalb die enzymatische Katalyse jedoch vor allem bei höheren Substratkonzentrationen nur noch unvollständig war, konnte an Hand der durchgeführten Messreihen erst einmal nicht geklärt werden. Daher erfolgten weiterführende Untersuchungen, um die Zusammenhänge hinsichtlich der Prozessierung hoher Substratkonzentrationen, geringer Enzymmengen und dem zeitlichen Verlauf der Proteolyse-reaktion besser erfassen zu können.

3.1.2.4 Enzymkinetische Untersuchungen

Die charakteristische hyperbolische Abhängigkeit der katalytischen Aktivität eines Enzyms von der Substratkonzentration wird durch die enzymkinetische Theorie nach MICHAELIS-MENTEN in vereinfachter Form wiedergegeben.^[279, 280] Unter der Voraussetzung, dass sich bei der Bindung eines Substrates **S** an ein Enzym **E** ein Gleichgewichtszustand einstellt und dieses bei

einem Überschuss des Substrates **S** auf der Seite des Produktes **P** liegt, kann folgender Zusammenhang postuliert werden (**Gleichung 4**):



Die Gleichung beschreibt ein Fließgleichgewicht, wobei das Enzym **E** mit dem Substrat **S** zunächst in einer reversiblen ersten Teilreaktion den Enzym-Substrat-Komplex **ES** bildet. Aus diesem geht in einer zweiten Teilreaktion – welche sich wiederum aus mehreren Einzelschritten zusammensetzt – das Produkt **P** hervor. Dementsprechend kann der Verlauf der Konzentration aller Reaktionsteilnehmer einer enzymatisch katalysierten Reaktion in Abhängigkeit von der Zeit in Phasen unterteilt und schematisch dargestellt werden (vgl. **Abbildung 3.5**).^[281, 282] In Gegenwart hoher Konzentrationen des Substrates **S** erfolgt in der Anfangsphase zunächst der schnelle Aufbau des Enzym-Substrat-Komplexes **ES** (engl. *pre-steady state*). Danach bleiben die Konzentrationen der intermediären Spezies **ES** und des Enzyms **E** bei ausreichender Verfügbarkeit des Substrates **S** über längere Zeit konstant, wobei Bildung und Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes **ES** in einem Fließgleichgewicht liegen (engl. *steady state*). Dabei erfolgt über den gesamten betrachteten Zeitraum in der Anfangsphase eine schnelle Entstehung des Produktes **P** bedingt durch die zügige Umsetzung des Substrates **S**. Bei nur noch geringen Konzentrationen an Substrat **S** stagniert die Bildung des Produktes **P**, weshalb der Kurvenverlauf abflacht und der finale Gleichgewichtszustand der enzymatisch katalysierten Reaktion erreicht wird (engl. *equilibrium*).

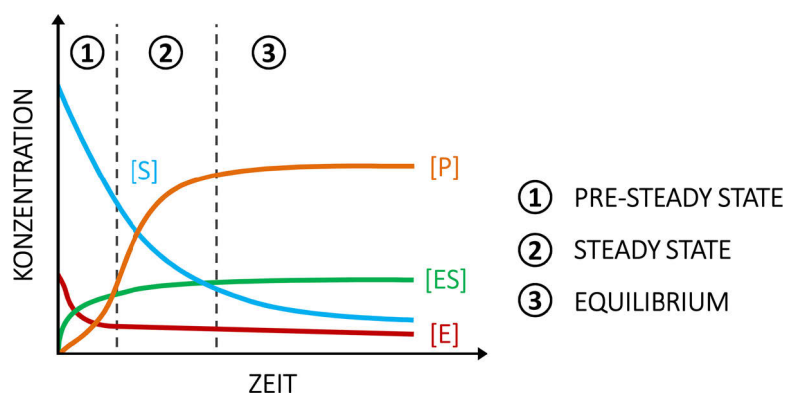


Abbildung 3.5. Theoretische Betrachtung des Zusammenhangs zwischen der katalytischen Aktivität eines Enzyms und der Substratkonzentration nach der enzymkinetischen Theorie von MICHAELIS-MENTEN. Durch die zeitabhängige Auftragung der Konzentrationen des Substrates **S**, des Enzyms **E**, des Enzym-Substrat-Komplexes **ES** sowie des gebildeten Produktes **P** können die Anfangsphase (engl. *pre-steady state*), das Fließgleichgewicht (engl. *steady state*) und der Gleichgewichtszustand (engl. *equilibrium*) enzymatisch katalysierter Reaktionen verdeutlicht werden. Die Konzentrationen von **E** und **ES** sind überproportional dargestellt.^[281, 282]

Die theoretischen Betrachtungen nach MICHAELIS-MENTEN zur Beschreibung enzymatisch katalysierter Reaktionen bildeten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Prozessierung hoher Mengen des nicht-bindenden Substrates **S4-PEG** durch die virale Cysteinprotease. In Bezug auf die zuvor erzielten Umsatzraten wurde die halbierte Enzymkonzentration von 28 Units TEV Protease zur Aktivierung von 1.00 mg und 1.50 mg des Biokonjugates verwendet. Die Entstehung der proteolytisch abgetrennten Suppressionsdomäne

IF4^{ENZ} wurde mittels analytischer RP-HPLC-Messungen über einen Zeitraum von 48 Stunden verfolgt und die Umsatzraten unter Berücksichtigung der Substrateinheit dreifach bestimmt (vgl. **Abbildung 3.6**).^[267] Bedingt durch den hohen Substratüberschuss von **S4-PEG** zeigte sich in der Anfangsphase der enzymatisch katalysierten Reaktion ein schneller Verbrauch des Peptid-PEG-Konjugates. Für beide Eduktmengen wurden mit Umsatzraten von 47 % bzw. 38 % innerhalb der ersten 4 Stunden bereits über die Hälfte der finalen Substratumsetzung erzielt. Das Abflachen der beiden Kurven in den nachfolgenden 8 Stunden veranschaulichte den charakteristischen Übergang enzymatisch katalysierter Reaktionen von der Phase *steady state* zu *equilibrium*, wobei im Gleichgewichtszustand Umsatzraten von bis zu 79 % bzw. 60 % erzielt wurden. Durch eine Dreifachbestimmung der Produktbildung von **IF4^{ENZ}** konnte eine Messunsicherheit des Gerätes von maximal 3 % ermittelt werden, wodurch die beiden verminderten Umsatzraten in den zuvor durchgeführten Messreihen (vgl. **Tabelle 3.3** Seite 39) erklärt werden konnten. Ein direkter Vergleich der zeitabhängigen Prozessierung von 1.00 mg und 1.50 mg des nicht-bindenden Biokonjugates **S4-PEG** ergab, dass für beide Substratmengen die maximalen Umsetzungen nach 12 Stunden erzielt wurden. Die zeitgleiche Stagnation der Produktbildung legte die Vermutung nahe, dass die katalytische Aktivität der TEV Protease zeitlich begrenzt ist. Auch wenn das kommerziell erworbene Enzym vom Anbieter *Roboklon* gentechnisch verändert wurde (vgl. Kapitel 2.4.2 Seite 14), können autolytische Abbaumechanismen unter den gegebenen Reaktionsbedingungen hinsichtlich des pH-Wertes, der Ionenstärke und der Temperatur nicht ausgeschlossen werden. In Abhängigkeit der eingeführten Enzymmutation können bis zu 50 % der viralen Cysteinprotease nach 8 Stunden abgebaut werden und zu einem Verlust der katalytischen Aktivität führen.^[162] Dies könnte erklären, weshalb bei der enzymatischen Aktivierung von **S4-PEG** nach 12 Stunden keine weiterer Substratumsatz beobachtet wurde.

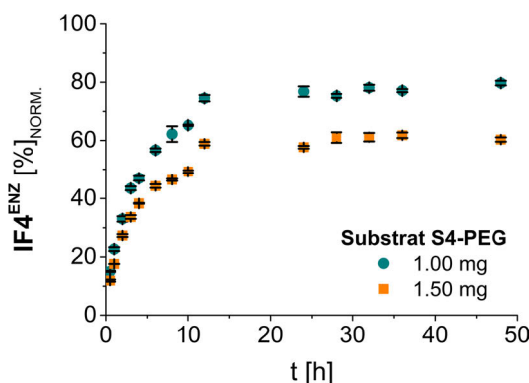


Abbildung 3.6. Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Aktivierung verschiedener Konzentrationen **S4-PEG**. Gradient RP-HPLC: 0.0 – 2.0 min: 20 %, 2.0 – 15.0 min: 20 – 65 % Acetonitril in H₂O (0.1 % HCOOH, v/v/v), 210 nm. Bedingungen Proteolyse: 1.00 mg und 1.50 mg **S4-PEG**, 28 Units TEV Protease, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 30 °C. Inhibierung: 10 mM Iodacetamid.

Die nach der enzymkinetischen Theorie von MICHAELIS-MENTEN initiale Phase *pre-steady state* konnte an Hand der gewählten Bedingungen von Substrat- und Enzymkonzentration nicht beobachtet werden. Dieser würde weitere Einblicke hinsichtlich der katalytischen Aktivität der TEV Protease zur Prozessierung des nicht-bindenden Peptid-PEG-Konjugates ermöglichen. In der Praxis würde dies Umsatzbestimmungen unter Initialbedingungen in einem geringen Zeit-

intervall erfordern, wobei die Änderungen von Substrat- und Produktkonzentration vernachlässigbar minimal sein müssen. Durch Variation hoher Substratkonzentrationen bei geringen Enzymmengen könnten kinetische Parameter wie beispielsweise die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden. Jedoch lagen die dafür zu quantifizierenden Produktkonzentrationen unterhalb der Empfindlichkeit der analytischen RP-HPLC-Messungen, weshalb keine zuverlässigen Aussagen getroffen werden konnten. Ungeachtet dessen offerierte die 79%ige Umsetzung von 1.00 mg **S4-PEG** unter Verwendung von 28 Units TEV Protease ein optimales Verhältnis hinsichtlich einer effizienten Prozessierung hoher Substratmengen. Dieses Resultat ermöglichte gezielte Untersuchungen hinsichtlich der adhäsiven Eigenschaften des aktivierbaren Biokonjugates auf Titandioxid-Oberflächen sowie einen direkten Vergleich des Adsorptionsverhaltens des enzymatisch aktivierten Binders **G-TBP-PEG^{ENZ}** mit der Oberflächenhaftung der synthetischen Referenz **G-TBP-PEG^{CHEM}**.

3.1.3 ADSORPTIONSVERHALTEN AUF TITANDIOXID-OBERFLÄCHEN

3.1.3.1 *Enzymatisch aktivierte Adsorption des nicht-bindenden Peptid-PEG-Konjugates*

Hervorgehend aus den Ergebnissen der quantitativen Analyse der enzymatischen Aktivierung von **S4-PEG** konnten Haftungsexperimente mittels QCM-D auf Titandioxid-Oberflächen durchgeführt werden. Dementsprechend wurden 1.00 mg des nicht-bindenden Biokonjugates mit 28 Units TEV Protease für 16 Stunden bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert und mittels analytischer RP-HPLC-Messungen ein Substratumsatz von 78 % indirekt bestimmt. Anschließend wurde die Aktivierungslösung nach einer Verdünnung von 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf die Sensoroberfläche aufgetragen.^[267] **Abbildung 3.7** zeigt die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des enzymatisch prozessierten **S4-PEG** im Vergleich zu den Frequenzverschiebungen des nicht-aktivierten Vorläufers und des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** unter den gepufferten Bedingungen der enzymatischen Aktivierung. Weiterhin wurden Referenzmessungen für das chemische Analogon der simultan gebildeten Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}** und der zur Aktivierung verwendeten Enzymkonzentration an TEV Protease [28 Units] durchgeführt. Für das enzymatisch aktivierte Substrat **S4-PEG** konnte nach der Äquilibrierungsphase ein rascher Frequenzabfall auf – 22 Hz in den ersten 7 Minuten verzeichnet werden. Dies entsprach einer Beschichtung von 69 % gemessen an der Frequenzverschiebung von – 32 Hz während der Inkubationsphase.^[267] Die initiale Massenlagerung auf der Metalloxid-Oberfläche war identisch mit der des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** unter Aktivierungsbedingungen. Dessen Adsorptionsverhalten führte ebenfalls zu einer Frequenzänderung von – 22 Hz nach einer Inkubationszeit von 7 Minuten. Der geringfügige Unterschied hinsichtlich der maximalen Frequenzänderung von – 31 Hz während der Inkubationsphase im Vergleich zu der von **G-TBP-PEG^{CHEM}** erzielten in reinem Phosphat-Puffer (vgl. **Abbildung 3.2a** Seite 43) konnte auf die Gegenwart des Protease-Puffers zurückgeführt werden. Reproduzierbare Messungen erlaubten die Schlussfolgerung, dass die erhöhte Ionenkonzentration der Lösung durch die Puffersalze Tris-HCl und NaCl zu verminderten Wechselwirkungen der adhäsiven Spezies mit der Oberfläche führten. Somit wurde die Rück-

bildung der Haftungseigenschaften von **G-TBP-PEG^{ENZ}** durch proteolytische Spaltung des Substrates **S4-PEG** an Hand der Vergleichbarkeit der maximalen Frequenzverschiebungen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** und des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** erfolgreich nachgewiesen. Dieses Resultat belegte die Realisierbarkeit des Konzeptes der enzymatisch aktivierbaren Adsorption eines nicht-bindenden Biokonjugates, um eine effiziente Beschichtung für Titandioxid-Oberflächen zu erzeugen.

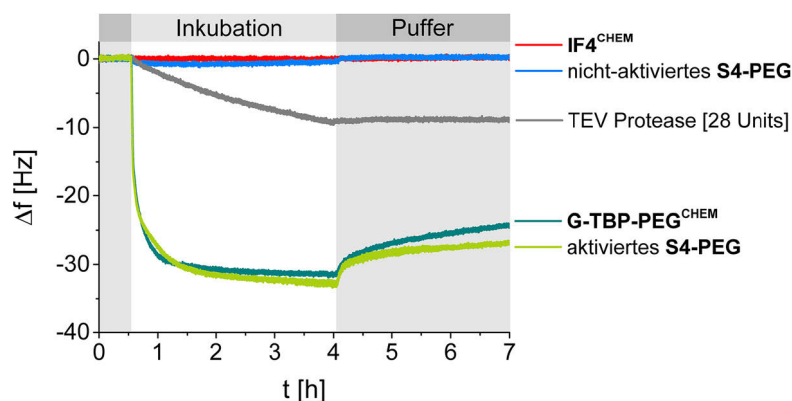


Abbildung 3.7. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** im Vergleich zu den Frequenzverschiebungen des nicht-aktivierten Vorläufers und des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}**. Das Adsorptionsverhalten des chemischen Analogons der Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}** und der TEV Protease [28 Units] wurde ebenfalls untersucht. Für die Aktivierung wurden 1.00 mg **S4-PEG** für 16 Stunden mit 28 Units TEV Protease in Gegenwart des Protease-Puffers bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert und die Lösung nach einer Verdünnung von 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgetragen. Das nicht-aktivierte **S4-PEG**, die synthetischen Analoga **G-TBP-PEG^{CHEM}** und **IF4^{CHEM}** sowie die Enzymreferenz wurden ebenfalls mit Protease-Puffer behandelt und nach einer Verdünnung von 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) vermessen. Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Aktivierungs- bzw. Referenzlösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der proteolytisch abgetrennten Suppressionsdomäne **IF4^{ENZ}** wurde entsprechend des zuvor ermittelten Substratumsatzes von **S4-PEG** eine Referenzlösung des synthetischen Analogons **IF4^{CHEM}** in Protease-Puffer hergestellt. Nach einer Verdünnung von 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) wurde diese auf den Sensorkristall gegeben, wobei während der Inkubationsphase keine Änderung der Resonanzfrequenzen verzeichnet werden konnte.^[267] Folglich wurden die Moleküle der abgespaltenen Suppressionsdomäne nicht an der Metalloxid-Oberfläche angelagert. Für die Referenzexperimente des nicht-aktivierten Substrates **S4-PEG** und der TEV Protease [28 Units] wurden Lösungen basierend auf den zur Aktivierung verwendeten Konzentrationen in Protease-Puffer angesetzt und diese anschließend ebenfalls in Phosphat-Puffer verdünnt. Die Messung des nicht-aktivierten **S4-PEG** zeigte, dass das unbehandelte Peptid-PEG-Konjugat nur minimal haftete und im nachfolgenden Spülschritt wieder vollständig von der Oberfläche entfernt werden konnte.^[267] Dabei entsprach die Massenlagerung lediglich 3 % der durch die Aktivierung von **S4-PEG** erzeugten Beschichtung gemessen an der detektierten Frequenzänderung von maximal -1 Hz und konnte somit vernachlässigt werden. Die Referenzlösung der viralen Cysteinprotease dagegen bewirkte eine leichte und irreversible Bindung auf TiO₂, wobei nach einer Inkubationszeit 3.5 Stunden eine Frequenzänderung von -9 Hz erhalten wurde. Im

Vergleich zu der Adsorptionskinetik des enzymatisch aktivierten Substrates **S4-PEG** wies das Enzym jedoch eine deutlich verlangsamte Haftung auf, wohingegen der entstandene Binder **G-TBP-PEG^{ENZ}** zügig an der Oberfläche akkumuliert wurde.^[267] Da die initiale Materialanreicherung des enzymatisch generierten Biokonjugates mit der des synthetischen Analogons **G-TBP-PEG^{CHEM}** identisch war, konnte von einer Beeinflussung durch die Oberflächenhaftung der TEV Protease zu Beginn der Inkubationsphase abgesehen werden. Das unterschiedliche Adsorptionsverhalten von Enzym und synthetischem Binder ermöglichte eine Auftragung des prozessierten **S4-PEG** direkt aus der Aktivierungslösung.

Dennoch ergab die Adsorptionsisotherme des enzymatisch aktivierten Substrates **S4-PEG** gegenüber der Frequenzverschiebung von **G-TBP-PEG^{CHEM}** leichte Unterschiede. Die Oberflächenanlagerung des proteolytisch freigesetzten Binders **G-TBP-PEG^{ENZ}** schien weniger homogen zu verlaufen als die der synthetischen Referenz. Darüber hinaus konnte innerhalb des betrachteten Zeitraums von 3.5 Stunden die Gleichgewichtseinstellung zwischen Adsorption und Desorption nicht vollständig erreicht werden. Aufgrund der adhäsiven Eigenschaften der TEV Protease wurde vermutet, dass es zu einer überlagerten Materialanreicherung von enzymatisch generiertem Biokonjugat **G-TBP-PEG^{ENZ}** und Enzym auf der Oberfläche gekommen war. Dementsprechend wurden für das chemische Analogon **G-TBP-PEG^{CHEM}** enzymabhängige Adsorptionsmessungen durchgeführt, um den Einfluss der viralen Cysteinprotease auf die Massenanlagerung des Biokonjugates ermitteln zu können.

3.1.3.2 *Enzymabhängige Adsorption des adhäsiven Peptid-PEG-Konjugates*

Die Haftungseigenschaften der TEV Protease schienen die initiale Adsorption des enzymatisch erzeugten Binders **G-TBP-PEG^{ENZ}** nicht zu beeinträchtigen, so dass das Peptid-PEG-Konjugat schnell an der Metalloxid-Oberfläche angelagert wurde. Dennoch berechtigte der Verlauf der Adsorptionsisothermen des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** verglichen mit dem der synthetischen Referenz **G-TBP-PEG^{CHEM}** zu der Vermutung, dass die virale Cysteinprotease während der Inkubationsphase auf die gebildete Biokonjugat-Beschichtung einwirken könnte. Das Phänomen des kompetitiven Austausches adsorbierter Proteine wurde erstmalig im Zusammenhang mit Studien zu Wechselwirkungen von Blutplasmae Proteinen an der Grenzfläche zwischen flüssiger und fester Phase beobachtet und wird als VROMAN-Effekt bezeichnet.^[283] Demnach kann bei der zeitgleichen Inkubation verschiedener Proteine ein Austausch der initial an der Oberfläche angereicherten Spezies durch ein zeitverzögert adsorbierendes Protein erfolgen. Dabei haften zunächst biologische Verbindungen mit kleinerem Molekulargewicht und höherer Mobilität auf dem betreffenden Material, welche im weiteren Verlauf der Massenanlagerung durch weniger mobile Proteinstrukturen mit stärkerer Oberflächenaffinität und meist höherem Molekulargewicht verdrängt werden.^[284, 285] Die erhöhte Affinität kann in der Regel durch die konformelle Flexibilität größerer Proteine erklärt werden, welche im Vergleich zu kleineren Proteinen mehr Oberflächenkontakte ausbilden und somit eine stärkere Bindung bewirken können.^[286] Darüber hinaus ist der VROMAN-Effekt sowohl von den vorliegenden Konzentrationsverhältnissen der verschiedenen Proteine als auch von der Inkubationszeit abhängig.^[287] Die Massenanlagerung der biologischen Verbindungen mit der höheren Konzen-

tration überwiegt direkt nach der Exposition aufgrund einer erhöhten Kontaktrate. Mit der Zeit erfolgen verschiedene Austauschprozesse, so dass die weniger konzentriert vorliegenden Proteine mit einer stärkeren Affinität die Materialanreicherung dominieren, bis schließlich nur noch die Proteine mit der größten Oberflächenaffinität gebunden sind. Die oftmals überlagerten Mechanismen der kompetitiven Haftung und des Austausches der auf der Oberfläche akkumulierten Moleküle sind experimentell nur schwierig voneinander zu differenzieren.^[287]

Bedingt durch die verschiedenen Bindungskinetiken des enzymatisch generierten Peptid-PEG-Konjugates **G-TBP-PEG^{ENZ}** und der TEV Protease während der initialen Inkubationsphase sowie die unterschiedlichen Molekulargewichte von $M_n = 5.7$ kDa bzw. $M_n = 28.6$ kDa^[278] könnte der VROMAN-Effekt bei Haftung des enzymatisch aktivierten Substrates **S4-PEG** ebenfalls wirksam werden. Daher wurden enzymabhängige Messungen zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der viralen Cysteinprotease durchgeführt, um die Auswirkungen möglicher Austauschprozesse auf der Metalloxid-Oberfläche nachvollziehen zu können. Dabei sollte vor allem in Bezug auf die zur Aktivierung verwendeten Enzymkonzentration von 28 Units TEV Protease eine Verdrängung des Biokonjugates durch das höhermolekulare Protein ausgeschlossen werden. Dies würde den Bedeckungsgrad der PEGylierten Adhäsionsdomäne auf der Oberfläche reduzieren und könnte sich nachteilig auf potentielle Antifouling-Eigenschaften der Beschichtung auswirken.

Für die entsprechenden Experimente wurden Enzymmengen zwischen 28 Units und 111 Units (0.5 – 2.0 Äq. TEV Protease) zusammen mit **G-TBP-PEG^{CHEM}** in Protease-Puffer aufgenommen und die Referenzlösungen 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf die Sensoroberfläche aufgetragen. **Abbildung 3.8** zeigt die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart der verschiedenen Enzymkonzentrationen und der Frequenzverschiebungen des reinen Biokonjugates. Um eine Oberflächenhaftung des Protease-Puffers bzw. der enthaltenden Salze Tris-HCl und NaCl sowie des Reduktionsmittels 2ME auszuschließen, wurde das zur Aktivierung verwendete Puffermedium nach einer Verdünnung in Phosphat-Puffer vermessen, wobei keine Adsorption auf der Metalloxid-Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Die Inkubation von **G-TBP-PEG^{CHEM}** zusammen mit 28 Units bzw. 56 Units TEV Protease führte durch den Einfluss des Enzyms zu Frequenzänderungen um – 36 Hz. Somit wurde im Vergleich zu der Oberflächenhaftung des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** ohne die Gegenwart der viralen Cysteinprotease eine verstärkte Massenanlagerung verzeichnet. Dabei verliefen die Adsorptionsisothermen der enzymabhängigen Referenzmessungen zu Beginn der Inkubationsphase parallel zu der des reinen Biokonjugates. Aufgrund des nahezu identischen Adsorptionsverhaltens schien der Austausch der auf der Oberfläche gebundenen Moleküle von **G-TBP-PEG^{CHEM}** durch das Enzym minimal zu sein. Vermutlich bewirkten kooperative Effekte von Biokonjugat und katalytisch aktivem Protein die Coadsorption^[288] der beiden Spezies, so dass geringe Enzymmengen in die Beschichtungen eingelagert wurden. Zusätzlich zeigte sich eine verminderte Reversibilität der Massenanlagerung während des anschließenden Spülschrittes mit Phosphat-Puffer. In Gegenwart von 28 Units TEV Protease wurden lediglich 18 % des Materials und bei der zeitgleichen Inkubation von 56 Units des Enzyms nur 15 % der Masse von der Metalloxid-

Oberfläche abgetragen. Im Vergleich dazu wurde für die Beschichtung des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** ein höherer Massenverlust von etwa 23 % verzeichnet.

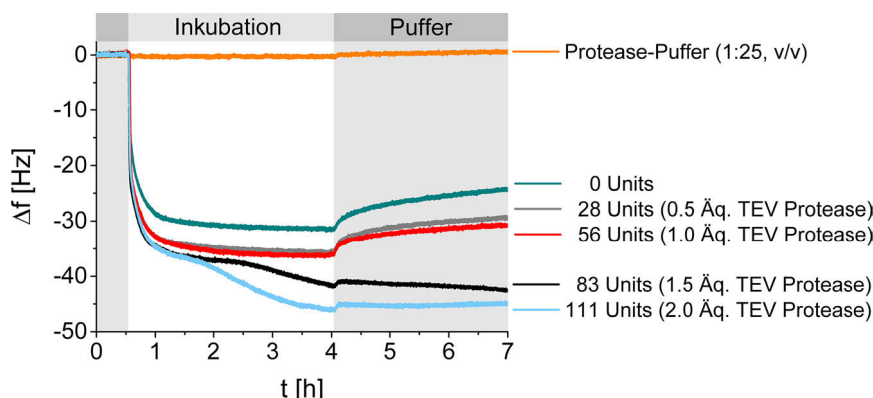


Abbildung 3.8. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart verschiedener Enzymkonzentrationen zwischen 28 Units und 111 Units TEV Protease (0.5 – 2.0 Äq.) im Vergleich zu den Frequenzverschiebungen des reinen Peptid-PEG-Konjugates (0 Units) sowie einer Referenzlösung des Protease-Puffers. Die entsprechenden Verhältnisse Biokonjugat/Enzym wurden in Protease-Puffer aufgenommen und die Lösungen nach einer Verdünnung von 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgetragen. Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Referenzlösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

In Gegenwart höherer Enzymkonzentrationen von 83 Units und 111 Units TEV Protease konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Adsorptions- und Desorptionsisothermen gegenüber den vorangegangenen Messungen beobachtet werden. Zu Beginn der Auftragung zeigte sich ein rascher Frequenzabfall bedingt durch die schnelle Akkumulation der adhäsiven Spezies **G-TBP-PEG^{CHEM}** an der Oberfläche, wobei zunächst die Einstellung des charakteristischen Gleichgewichtszustandes angestrebt wurde. Nach Inkubationszeiten von etwa 2 Stunden bzw. 1.5 Stunden ergab sich jedoch eine stetig zunehmende Materialanreicherung auf der Oberfläche. Die zeitlich verzögerte und gleichzeitig stärkere Oberflächenaffinität der viralen Cysteinprotease erhöhte die Frequenzänderung in Gegenwart von 83 Units Enzym auf – 42 Hz und führte bei der Konzentration von 111 Units TEV Protease zu Frequenzverschiebungen von bis zu – 46 Hz während der Inkubationsphase. Im anschließenden Spülschritt konnten die Beschichtungen mit einem Massenverlust von maximal 2 % nur unwesentlich von der Oberfläche gelöst werden. Demzufolge schien der VROMAN-Effekt erst in Gegenwart höherer Enzymmengen wirksam zu werden und zu einer Verdrängung des leichteren Biokonjugates **G-TBP-PEG^{CHEM}** durch das höhermolekulare Protein zu führen. Eine quantitative Aussage hinsichtlich der veränderten Zusammensetzung der Beschichtung konnte an Hand der durchgeführten Messungen nicht getroffen werden.

Durch die simultan aufgezeichneten Dissipationsänderungen und die damit repräsentierten Dämpfungseigenschaften konnte das viskoelastische Verhalten der adsorbierten Schichten von synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Abhängigkeit der verwendeten Enzymkonzentration charakterisiert werden (vgl. **Abbildung 3.9**). Ohne den Zusatz der viralen Cysteinprotease bewirkte die Massenlagerung des reinen Biokonjugates eine Dissipationsänderung von $2.3 \cdot 10^{-6}$, während die Gegenwart von 28 Units bzw. 56 Units TEV Protease zu

größerer Werten über $3.0 \cdot 10^{-6}$ führte. Dementsprechend führte die vermutete Coadsorption des höhermolekularen Enzyms zu einer stärkeren Dämpfung der Eigenschwingungen der Sensor-kristalle und erhöhte die viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtungen. Die Adsorption von **G-TBP-PEG^{CHEM}** bei Konzentrationen von 83 Units und 111 Units der viralen Cysteinprotease bewirkte zunächst eine ähnliche Tendenz zu erhöhten Viskoelastizitäten des auf der Oberfläche angelagerten Materials. Dahingegen erfolgte nach 1 Stunde Inkubationszeit eine Abnahme der Dissipationsänderungen mit einer unregelmäßigen verlaufenden Isotherme. Die Unstetigkeiten können auf eine erhöhte Mobilität der auf der Oberfläche angereicherten Spezies hindeuten. Dies könnte aus einer vermehrte Einlagerung von Enzym-Molekülen in die Beschichtungen unter zunehmender Verdrängung der initial adsorbierten Moleküle von **G-TBP-PEG^{CHEM}** resultieren. Demnach wurden die gebildeten Biokonjugat-Beschichtungen durch das zeitverzögert bindende Enzym erst ab Konzentrationen von 83 Units TEV Protease entscheidend beeinflusst. Die Umgestaltung und veränderte Zusammensetzung des angelagerten Materials führte zur Ausbildung rigiderer Filme. Jedoch ist zu betonen, dass die schnelle Adsorption des Biokonjugates zu Beginn der Inkubation gegenüber den Haftungseigenschaften der Cysteinprotease dominierte. Sogar in Gegenwart der maximalen Enzymkonzentration von 111 Units TEV Protease führte die höhere Oberflächenaffinität des Proteins erst nach etwa 1 Stunde zu einem Austausch der an der Oberfläche gebundenen Biokonjugat-Moleküle. Dahingegen wurden die Massenanlagerungen des synthetischen **G-TBP-PEG^{CHEM}** auf Titan-dioxid-Oberflächen unterhalb von 83 Units Enzym nur unwesentlich beeinflusst.

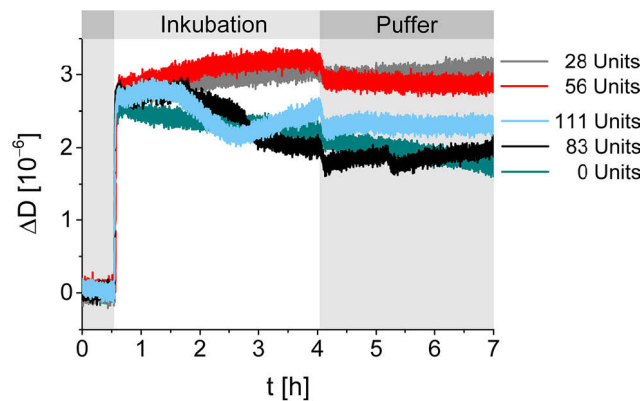


Abbildung 3.9. Dissipationsänderungen der QCM-D-Messungen des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart der verschiedenen Enzymkonzentrationen zwischen 28 Units und 111 Units TEV Protease zur Charakterisierung der Dämpfungseigenschaften der gebundenen Filme.

Veränderungen hinsichtlich der viskoelastischen Eigenschaften und der Struktur von Beschichtungen in Abhängigkeit der Materialanreicherung auf der Oberfläche können durch die Auftragung der Frequenzverschiebungen Δf gegenüber den Dissipationsänderungen ΔD erfasst werden.^[289, 290] Während ein steilerer Anstieg des Verhältnisses $\Delta D/\Delta f$ mit einer erhöhten Einlagerung von Wassermolekülen sowie einer flexibleren Konformation der gebundenen Moleküle assoziiert werden kann, deutet ein flacherer Anstieg auf die Ausbildung rigider Filme hin.^[291, 292] Die entsprechenden Graphen für die Inkubationsphase der QCM-D-Messungen des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart der verschiedenen Enzymkonzentrationen

trationen sind in **Abbildung 3.10** dargestellt. Die Beschichtung des reinen Biokonjugates **G-TBP-PEG^{CHEM}** ergab einen hyperbolischen Zusammenhang zwischen den Dämpfungseigenschaften des gebundenen Films und der Materialanreicherung auf der Oberfläche. Dabei bewirkte die schnelle initiale Haftung des Peptid-PEG-Konjugates zunächst einen Anstieg der Dissipation, welche zum Ende der Inkubationsphase geringfügig abnahm. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass durch die zunehmende Bedeckung der Oberfläche der Raum für die seitlichen Bewegungen der gebundenen Moleküle auf dem oszillierenden Sensor verringert wurde^[289, 293, 294] und zu leicht verminderten Viskoelastizitäten im Sättigungsbereich führte.

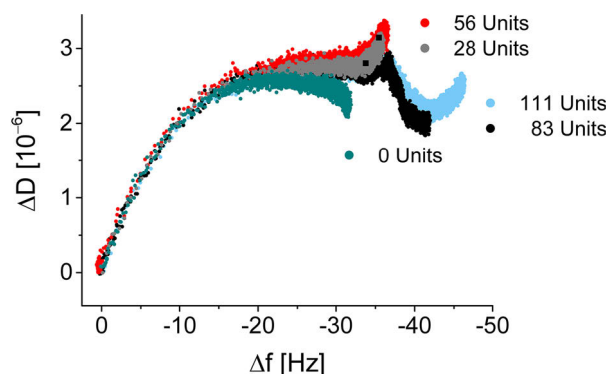


Abbildung 3.10. Auftragung der Dissipationsänderungen gegenüber den Frequenzverschiebungen zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtungen des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart der verschiedenen Enzymkonzentrationen zwischen 28 Units und 111 Units TEV Protease.

Für die Adsorption des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Abhängigkeit der verschiedenen Enzymkonzentrationen ergab die Auftragung von ΔD gegenüber Δf im Bereich geringerer Massenlagerungen einen ähnlichen hyperbolischen Verlauf. Erst bei höheren Frequenzverschiebungen führte der Einfluss der verschiedenen Konzentrationen der viralen Cysteinprotease zu unterschiedlichen Tendenzen hinsichtlich der Dämpfungseigenschaften. Die zeitgleiche Inkubation von 28 Units und 56 Units Enzym bewirkte bei Frequenzänderungen zwischen -33 Hz und -36 Hz einen leichten Anstieg der Dissipationsänderungen. Dabei zeichnete sich für den betrachteten Abschnitt ein linearer Zusammenhang zwischen ΔD und Δf ab. Die erhöhten Viskoelastizitäten der Beschichtungen deuteten auf eine veränderte strukturelle Organisation der auf der Metalloxid-Oberfläche akkumulierten Moleküle bedingt durch die Coadsorption der TEV Protease hin. Eine entsprechende Auswertung der QCM-D-Messungen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** in Gegenwart von 83 Units und 111 Units Enzym ergaben oberhalb der Frequenzverschiebungen von -36 Hz eine Abnahme der Dissipationen. Die verminderten Dämpfungseigenschaften können sowohl auf die Adsorption dünner und rigider Proteinfilme als auch auf die Ausbildung überlagerter Schichten mit zunehmender Rigidität hinweisen.^[295] Durch die erhöhte Oberflächenaffinität der maximalen Enzymkonzentration konnte im Bereich der höchsten Massenlagerung einen erneuten Anstieg der Dissipationsänderungen verzeichnet werden. Die ursprünglich angestrebten Dissipationswerte von $2,9 \cdot 10^{-6}$ konnten jedoch nicht mehr erreicht werden. Demnach führte die zunehmende Verdrängung der gebundenen Biokonjugat-Moleküle durch die TEV Protease zu entscheidenden Veränderungen hinsichtlich der Zusammensetzung der Beschichtungen unter Ausbildung rigiderer Filme.

An dieser Stelle ist zusammenfassend festzuhalten, dass die virale Cysteinprotease das Adsorptionsverhalten des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** sehr unterschiedlich beeinflusste. Bei höheren Enzymkonzentrationen verdrängte das höhermolekulare Protein das Peptid-PEG-Konjugat von der Metalloxid-Oberfläche. Dementsprechend dominierte das Enzym die viskoelastischen Eigenschaften der gebundenen Schichten und führte mit der Zeit zu rigideren Filmen. Dagegen konnten niedrigere Enzymmengen – insbesondere die zur Aktivierung des nicht-bindenden Substrates **S4-PEG** verwendete Konzentration von 28 Units TEV Protease – aufgrund der zeitlich begrenzten Inkubationsphase nur einen geringen Effekt ausüben. Durch die Coadsorption des Biokonjugates **G-TBP-PEG^{CHEM}** und der virale Cysteinprotease wurde der Massenverlust reduziert und die Viskoelastizität der gebildeten Beschichtungen erhöht. Die durchgeführten Referenzmessungen ermöglichten eine Evaluierung der enzyminduzierten Adsorption hinsichtlich der kooperativen Effekte der TEV Protease.

3.1.3.3 Einfluss der Cysteinprotease auf die enzymatisch generierte Beschichtung

Wie bereits in **Kapitel 3.1.3.1** beschrieben, zeigte die QCM-D-Messung des enzymatisch aktivierten Substrates **S4-PEG** stetig zunehmende Frequenzverschiebungen während der Inkubationsphase, wobei das Sättigungsgleichgewicht zwischen adsorbierenden und desorbierenden Spezies nicht erreicht wurde. Um eine mögliche Einwirkung der TEV Protease auf das Adsorptionsverhalten des durch die Aktivierung gebildeten Biokonjugates **G-TBP-PEG^{ENZ}** untersuchen zu können, musste die komplexe Zusammensetzung der Aktivierungslösung berücksichtigt werden. Daher wurde entsprechend des zuvor ermittelten Umsatzes des nicht-bindenden **S4-PEG** von 78 % eine artifizielle Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] bestehend aus den synthetischen Analoga des Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** und der abgetrennten Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}** sowie dem verbleibenden Edukt **S4-PEG** in Protease-Puffer hergestellt.^[267] Nach einer Verdünnung von 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) wurde die Referenzlösung auf die Titandioxid-Oberfläche aufgetragen. In **Abbildung 3.11** sind die Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **REF1^{CHEM}** [78 %] den Frequenzverschiebungen des aktivierten Substrates **S4-PEG** und der Enzymreferenz der TEV Protease [28 Units] gegenübergestellt. Die Messung der artifiziellen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] ergab einen schnellen Frequenzabfall innerhalb der ersten 7 Minuten auf – 17 Hz. Verglichen mit der durch die Aktivierung von **S4-PEG** erzielten Frequenzänderung von bis zu – 32 Hz nach 3.5 Stunden Inkubation war die Verschiebung von **REF1^{CHEM}** [78 %] mit – 28 Hz leicht vermindert. Somit konnte der Beitrag des Enzyms zur Materialanreicherung auf etwa – 4 Hz angenommen werden. Diese fiel damit deutlich geringer aus als die Massenlagerung der reinen Cysteinprotease mit einer Frequenzänderung von – 9 Hz.^[267] Darüber hinaus wurde die Stabilität der Biokonjugat-Beschichtung durch die gebundenen Enzym-Moleküle erhöht – ähnlich wie bei der Referenzmessung des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart von 28 Units TEV Protease (vgl. **Kapitel 3.1.3.2** Seite 44). Die verminderte Reversibilität der adsorbierten Moleküle während des Spülschrittes mit Phosphat-Puffer verringerte den Massenverlust der Beschichtung auf 18 % verglichen mit dem der artifiziellen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] mit etwa 24 %. Ungeachtet dessen führte die Oberflächenhaftung von **REF1^{CHEM}** [78 %] zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Adsor-

ption und Desorption während der Inkubationsphase. Offenbar ist die langsam fortschreitende Frequenzverschiebung des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** auf den unvollständigen Substratumsatz von 78 % zurückzuführen. Folglich konnte das Enzym – bedingt durch die erhöhte Oberflächenaffinität höhermolekularer Proteine und verglichen mit der Referenzmessung von **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] bei einer Konzentration von 28 Units TEV Protease – einen minimal verstärkten Effekt auf die Beschichtung ausüben und möglicherweise eine leichte Verdrängung des Biokonjugates bewirken.

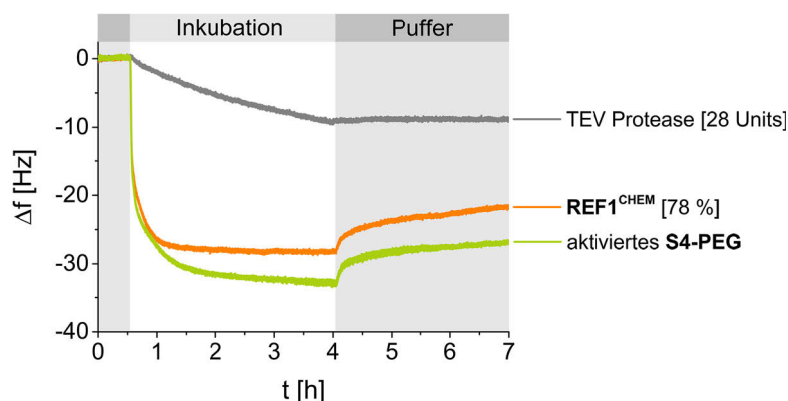


Abbildung 3.11. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der artifiziellen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] entsprechend des ermittelten Substratumsatzes von 78 % bestehend aus den synthetischen Analoga **G-TBP-PEG^{CHEM}** und **IF4^{CHEM}** sowie dem verbleibenden Edukt **S4-PEG** im Vergleich zu den Frequenzverschiebungen des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** und der TEV Protease [28 Units]. Die artifizielle Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] wurde mit Protease-Puffer behandelt und nach einer Verdünnung von 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgetragen. Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Aktivierungs- bzw. Referenzlösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Die viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtungen konnten an Hand der Auftragung der Dissipationsänderungen gegenüber den Frequenzverschiebungen miteinander verglichen werden (vgl. **Abbildung 3.12**). Erwartungsgemäß führte die Oberflächenhaftung der artifiziellen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] zu einem hyperbolischen Verlauf und bewirkte mit zunehmender Massenanlagerung Dissipationen im Bereich von $2.5 \cdot 10^{-6}$. Die Beschichtung des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** zeigte zunächst einen ähnlichen Zusammenhang zwischen der Massenanlagerung und den Dämpfungseigenschaften der gebundenen Filme. Erst im Bereich der maximalen Frequenzverschiebungen konnte – wie bereits zuvor für die Referenzmessung des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart von 28 Units TEV Protease (vgl. **Abbildung 3.10** Seite 48) – ein linearer Anstieg des Verhältnisses von $\Delta D/\Delta f$ mit einer Tendenz zu höheren Dissipationsänderungen um $3.0 \cdot 10^{-6}$ verzeichnet werden. Folglich bewirkte die Gegenwart der viralen Cysteinprotease eine ähnliche Veränderung hinsichtlich der viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtung mit einer erhöhten Flexibilität der auf der Oberfläche gebundenen Moleküle. Die Adsorption des reinen Enzyms dagegen ergab für die Auftragung von ΔD gegenüber Δf eine lineare Abhängigkeit. Aufgrund der deutlich geringeren Dissipationsänderung im Bereich von $1.3 \cdot 10^{-6}$ in Abhängigkeit der erzielten Frequenzverschiebung von maximal –9 Hz konnte die Massenanlagerung der TEV Protease mit der Ausbildung eines rigiden Films assoziiert werden.

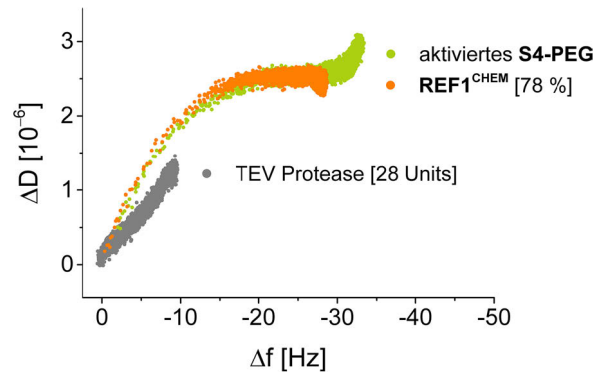


Abbildung 3.12. Auftragung der Dissipationsänderungen gegenüber den Frequenzverschiebungen zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtungen der künstlichen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] und des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** im Vergleich zu dem Verhältnis $\Delta D/\Delta f$ der TEV Protease [28 Units].

Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die Gegenwart von 28 Units TEV Protease aufgrund des unvollständigen Substratsatzes des nicht-bindenden Biokonjugates **S4-PEG** zu einem leicht veränderten Adsorptionsverhalten des enzymatisch generierten **G-TBP-PEG^{ENZ}** führte. Bedingt durch die zeitlich begrenzte Inkubation und die geringe Enzymkonzentration wurde der VORMAN-Effekt jedoch abgeschwächt. Dabei bewirkte die hier angenommene Coadsorption des Enzyms eine leichte Erhöhung der Viskoelastizität und verminderte den Massenverlust der Beschichtung im Vergleich zu der höheren Reversibilität des durch die künstliche Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] gebildeten Films. Eine weitere Möglichkeit zur Auswertung der gemessenen Frequenz- und Dissipationsänderungen und der damit einhergehenden Materialanreicherungen auf Titandioxid-Oberflächen bietet die Bestimmung der adsorbierten Massen nach den Modellen von SAUERBREY und VOIGT.

3.1.4 MASSENBESTIMMUNG NACH SAUERBREY UND VOIGT

Neben der Beschreibung des Adsorptionsverhaltens der Peptid-PEG-Konjugate an Hand der Frequenz- und Dissipationsänderungen können die aufgezeichneten Messwerte durch die physikalischen Modelle von SAUERBREY und VOIGT interpretiert werden, welche beide in der Modellierungssoftware QTools (*Q-Sense, Biolin Scientific, Stockholm, Schweden*) hinterlegt sind. Auf Grundlage der SAUERBREY-Gleichung^[243] (vgl. **Gleichung 1** Seite 24) konnten die Änderungen der Resonanzfrequenzen im Sättigungsbereich für die Obertöne $\Delta f_n/n$ mit $n = 3, 5, 7$ und 9 in die entsprechenden adsorbierten Massen $\Delta m_{\text{SAUERBREY}}$ umgerechnet und der dazugehörige Mittelwert gebildet werden (vgl. **Kapitel 5.3.3.3** Seite 114). Die Auswertung der Frequenzverschiebungen nach dem VOIGT-Modell^[249-251] erfolgte unter Berücksichtigung der Dissipationsobertöne ΔD_n durch das Anlegen einer Näherungsfunktion und ermöglichte die Bestimmung der Schichtdicke d_{VOIGT} der Systeme sowie der korrespondierenden adsorbierten Masse Δm_{VOIGT} . Ein detailliertes Protokoll zur Berechnung der Massenlagerungen nach VOIGT mittels QTools kann **Kapitel 5.3.3.4** (vgl. Seite 114) entnommen werden.

Die Berechnungen nach den beiden Modellen wurden für die Beschichtungen des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** und der künstlichen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] sowie der Referenzmessungen des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] sowohl ohne als auch in Gegen-

wart der TEV Protease [28 Units] durchgeführt (vgl. **Tabelle 3.4**).^[267] Bei der Interpretation nach VOIGT ergaben die Massenlagerungen in Gegenwart der TEV Protease – bedingt durch deren Oberflächenaffinität – erwartungsgemäß leichte Unterschiede gegenüber der Massenadsorption der enzymunabhängigen Referenzmessungen. Für den enzymatisch erzeugten Film konnte eine Schichtdicke $d_{\text{VOIGT}} = 5.6 \pm 0.6$ nm und eine adsorbierte Masse $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 627 \pm 72$ ng·cm⁻² ermittelt werden. Dagegen ergab sich für die Beschichtung von **REF1^{CHEM}** [78 %] eine leicht verringerte Massenadsorption von etwa 18 % entsprechend der ermittelten Werte $d_{\text{VOIGT}} = 4.6 \pm 0.4$ nm bzw. $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 552 \pm 48$ ng·cm⁻². Für die Materialanreicherung von **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] bei zeitgleicher Inkubation von 28 Units TEV Protease konnte eine ähnliche Massendifferenz berechnet werden. Die Gegenwart des viralen Enzyms führte zu einer Schichtdicke $d_{\text{VOIGT}} = 6.4 \pm 0.5$ nm und einer adsorbierten Masse $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 768 \pm 60$ ng·cm⁻². Dies entsprach einer 20 % höheren Materialanreicherung verglichen mit der Massenadsorption des reinen Biokonjugates mit $d_{\text{VOIGT}} = 5.1 \pm 0.4$ nm bzw. $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 612 \pm 48$ ng·cm⁻². Folglich konnte der Beitrag des Enzyms hinsichtlich der Massenlagerung im Sättigungsbereich in beiden Konstellationen als gleichwertig angesehen werden. Eine direkte Bestimmung der entsprechenden Stoffmengen war jedoch nicht möglich, da in die berechneten Massen die Masse der in die Beschichtungen eingelagerten Wassermoleküle miteinfließen.^[249] In Übereinstimmung mit den Schichtdicken PEG-modifizierter Oberflächen konnten die Systeme mit der Ausbildung von Monolagen assoziiert werden, wobei die Polymerketten in pilzartigen Konformationen angeordnet sind.^[296]

Tabelle 3.4. Schichtdicken und adsorbierten Massen nach VOIGT^[249-251] unter Berücksichtigung der Dämpfungseigenschaften der viskoelastischen Beschichtungen der artifiziellen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] und des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** sowie des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] sowohl in Gegenwart der TEV Protease [28 Units] als auch ohne Enzym. Zusätzlich wurden für die Systeme die adsorbierten Massen nach dem SAUERBREY-Modell^[243] bestimmt, durch welches der rigide Film der Enzymreferenz ebenfalls interpretiert werden konnte.

QCM-D-Experiment	VOIGT:		SAUERBREY: Δm [ng·cm ⁻²]				
	d [nm]	Δm [ng·cm ⁻²]	Ø	n = 3	n = 5	n = 7	n = 9
aktiviertes S4-PEG	5.6 ± 0.6	672 ± 72	523 ± 36	575	539	497	482
REF1^{CHEM} [78 %]	4.6 ± 0.4	552 ± 48	441 ± 36	496	445	427	396
G-TBP-PEG^{CHEM} /TEV Protease	6.4 ± 0.5	768 ± 60	562 ± 48	623	570	546	508
G-TBP-PEG^{CHEM} [100 %]	5.1 ± 0.4	612 ± 48	506 ± 32	552	516	489	465
TEV Protease [28 Units]	–	–	152 ± 9	162	159	142	143

Die Interpretation der Frequenz- und Dissipationsänderungen erfolgte durch die in der Software QTools hinterlegten physikalischen Modelle von SAUERBREY und VOIGT (vgl. **Kapitel 5.3.3.3** bzw. **Kapitel 5.3.3.4** Seite 114).

Die nach dem SAUERBREY-Modell berechneten adsorbierten Massen der Systeme führten grundsätzlich zu geringeren Werten als die entsprechenden Resultate nach VOIGT (vgl. **Tabelle 3.4**). So konnte für die Beschichtung des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** lediglich eine Massenlagerung $\Delta m_{\text{SAUERBREY}} = 523 \pm 36$ ng·cm⁻² ermittelt werden und somit um etwa 22 % niedriger war als die nach dem VOIGT-Modell berechnete Massenadsorption. Für die übrigen Messungen wurden ähnliche Massendiskrepanzen bestimmt, wobei die Werte für $\Delta m_{\text{SAUERBREY}}$ gegenüber Δm_{VOIGT} um bis zu 27 % verringert waren. Die Unterbewertung von Massenlagerungen nach

dem SAUERBREY-Modell aufgrund der Dämpfungseigenschaften viskoelastischer Beschichtungen ist bekannt^[249] und für die gebildeten Biokonjugat-Filme ebenfalls zutreffend. Dahingegen berücksichtigt das VOIGT-Modell den Einfluss der Dämpfungseigenschaften auf die erzielten Frequenzverschiebungen. Folglich ermöglicht die durch die SAUERBREY-Gleichung wiedergegebene direkte Proportionalität zwischen den gemessenen Resonanzfrequenzen und den adsorbierten Massen ausschließlich die Interpretation rigider Filme.^[297]

Im Allgemeinen wird bei einem linearen Zusammenhang zwischen Frequenz- und Dissipationsänderungen ein Verhältnis von $\Delta D_n/(-\Delta f_n/n) \ll 4 \cdot 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$ für einen 5 MHz Sensorkristall als gute Näherung für die Gültigkeit des SAUERBREY-Modells angesehen.^[298] Eine entsprechende Auswertung für die Referenzmessung der TEV Protease [28 Units] ergab einen Anstieg von $\Delta D_n = 3/(-\Delta f_n = 3/3) = 1.4 \cdot 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$, so dass die adsorbierte Masse des gebildeten Enzymfilms auf $\Delta m_{\text{SAUERBREY}} = 152 \pm 9 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ bestimmt werden konnte. Eine Berechnung der Massenlagerung nach dem VOIGT-Modell war für die Beschichtung der Enzymreferenz jedoch nicht möglich. Das Anlegen der Näherungsfunktion in QTools bewirkte diskontinuierlich verlaufenden Funktionsgraphen hinsichtlich der zu approximierenden Parameter (vgl. **Kapitel 5.3.3.4** Seite 114).^[267] Dieser Sachverhalt lieferte eine weitere Bestätigung für die Ausbildung eines rigiden Films durch die auf der Metalloxid-Oberfläche adsorbierte TEV Protease.

Durch die Bestimmung der adsorbierten Massen und Schichtdicken nach den physikalischen Modellen von SAUERBREY und VOIGT konnte die Viskoelastizität der Beschichtungen des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** und der artifiziellen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] sowie der enzymabhängigen Messung den synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart von 28 Units TEV Protease verdeutlicht werden. Dabei führte die Oberflächenaffinität der zur Aktivierung verwendeten minimalen Enzymkonzentration zu leicht erhöhten Massenlagerungen. In direktem Zusammenhang mit den in **Kapitel 3.1.3.2** (vgl. Seite 48) beschriebenen Dämpfungseigenschaften der gebundenen Filme kann der Einfluss der viralen Cysteinprotease als relativ gering eingestuft werden. Dahingegen ist ein verändertes Adsorptionsverhalten des synthetischen Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** in Gegenwart höherer Enzymmengen unverkennbar. Insbesondere die zunehmende Einlagerung der TEV Protease in die Beschichtung und die daraus hervorgehende Verdrängung der zuvor an der Metalloxid-Oberfläche gebundenen Biokonjugat-Moleküle war nicht von der Hand zu weisen. Dementsprechend war es erforderlich, die Antifouling-Eigenschaften der PEGylierten Adhäsionsdomäne **TBP** mittels QCM-D an Hand geeigneter Modellproteine zu untersuchen.

3.1.5 ANTIFOULING-EIGENSCHAFTEN DER SYNTHETISCHEN BIOKONJUGAT-BESCHICHTUNG

Die unerwünschte Bildung von Biofilmen auf zu medizinischen Zwecken eingesetzten Titanmaterialien und -implantaten wird hauptsächlich mit den im menschlichen Blut vorkommenden Plasmaproteinen in Verbindung gebracht.^[299] Dabei stellt Serumalbumin (Humanalbumin) mit etwa 60 % den Hauptbestandteil der Proteine im menschlichen Blutserum dar.^[300, 301] Um die Stabilität einer Beschichtung gegenüber der unspezifischen Adsorption von Proteinen ermitteln zu können, wird in Modellversuchen häufig das Rinderserumalbumin BSA verwendet. Hinsichtlich Struktur und Größe ist das globuläre Protein mit Humanalbumin vergleichbar und

kann kommerziell kostengünstig erworben werden.^[302] BSA besteht aus 583 Aminosäuren und weist eine molekulare Masse von 66.5 kDa auf.^[303] Das Protein verfügt über einen IEP von 4.7^[304] und eine Nettoladung von – 10 bei neutralen pH-Werten.^[305, 306] Die BSA-Struktur ist aus drei Proteindomänen aufgebaut, welche in Abhängigkeit des Ladungszustandes der Oberfläche die Haftung bewirken.^[303] So ermöglichen die kationischen Aminosäuren Lysin und Histidin sowie die anionischen Glutamin- und Asparaginsäure die BSA-Adsorption auf sowohl positiv als auch negativ geladenen Oberflächen.^[307] Bei einem pH-Wert oberhalb des IEPs des Proteins beispielsweise erfolgt die Anlagerung auf negativ geladenen Oberflächen auf der Basis kationischer Aminosäure-Seitenketten durch elektrostatische Wechselwirkungen. Somit ist die Oberflächenhaftung an den pH-Wert des Mediums gebunden, wobei die stärkste Proteinanbindung im Bereich des IEPs liegt.^[308] Sowohl unter- als auch oberhalb von pH-Werten des IEPs dagegen kann eine Abnahme der Proteinadsorption verzeichnet werden. Aufgrund des negativen Ladungszustandes der Titandioxid-Oberfläche und des Proteins bei neutralen pH-Werten beruht die Adsorption von BSA jedoch weniger auf elektrostatischen Wechselwirkungen.^[309] Vielmehr bewirken polare bzw. hydrophobe Interaktionen zwischen den Sauerstoffatomen und den sauren sowie basischen Hydroxylgruppen der Oberfläche die Haftung des Proteins. Dabei werden die in die Proteinhülle eingelagerten Wassermoleküle freigegeben, wodurch die Entropie des Systems gesteigert wird. Darüber hinaus handelt es sich bei BSA um ein konformell flexibles Protein, dessen globuläre Struktur sich relativ leicht an eine Oberfläche anpassen und eine hohe Anzahl an Bindungsstellen belegen kann.^[310]

Zur Untersuchung der Antifouling-Eigenschaften des synthetischen **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] wurde die Biokonjugat-Beschichtung mit einer Lösung von BSA mit einer Konzentration von 10 mg·mL⁻¹ in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) behandelt. Das Adsorptions- und Desorptionsverhalten von BSA gegenüber der beschichteten Oberfläche im Vergleich zu der Proteinadsorption auf unbehandeltem TiO₂ ist in **Abbildung 3.13a** dargestellt. Für das unbeschichtete Material konnte eine starke Haftung des Serumproteins verzeichnet werden, wobei eine Frequenzverschiebung von – 62 Hz nach einer Inkubation von 2.5 Stunden beobachtet wurde. Die Irreversibilität der Proteinablagerung zeigte sich durch eine nur geringfügige Abnahme der Resonanzfrequenz auf – 51 Hz während des anschließenden Spülschrittes. Im Vergleich dazu führte die BSA-Inkubation der beschichteten Oberfläche zu einer nachweisbaren Reduzierung der unspezifischen Wechselwirkungen des Proteins mit TiO₂. Entsprechend der Frequenzverschiebung von – 33 Hz nahe dem Sättigungsgleichgewicht konnte die Anzahl der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche für die Proteinablagerung um bis 47 % verringert werden. Im nachfolgenden Spülschritt zeigte sich an Hand der Desorptionsisotherme, dass die initialen Werte von 0 Hz nicht wieder erreicht wurden. Gemessen an der finalen Frequenzänderung von – 22 Hz konnte die BSA-Adsorption nur um etwa 57 % verringert werden. Dieses Resultat überraschte angesichts dessen, dass die Adhäsionsdomäne **TBP** bzw. das N-terminale Hexamer **RKLPDA (TBP6)** in der Literatur als starke Binder für Titandioxid-Oberflächen beschrieben sind.^[233, 234, 311] So konnten Konjugate aus dem Bindungsmotiv **TBP6** und antimikrobiellen Peptiden bereits erfolgreich zur Abschirmung der Oberfläche gegenüber der unspezifischen Haftung eines Lysozyms verwendet werden und zeigten antimikrobielle Aktivität gegenüber dem Bakterium *Porphyromonas gingivalis*.^[312] Demnach konnte der im Zusammenhang mit

den enzymabhängigen Referenzmessungen beobachtete VROMAN-Effekt bzw. die Verdrängung der gebundenen Biokonjugat-Moleküle von **G-TBP-PEG^{CHEM}** durch höhere Konzentrationen der viralen Cysteinprotease (vgl. **Kapitel 3.1.3.2** Seite 44) bereits als ein Hinweis auf die unzureichenden Antifouling-Eigenschaften des synthetischen Binders gewertet werden.

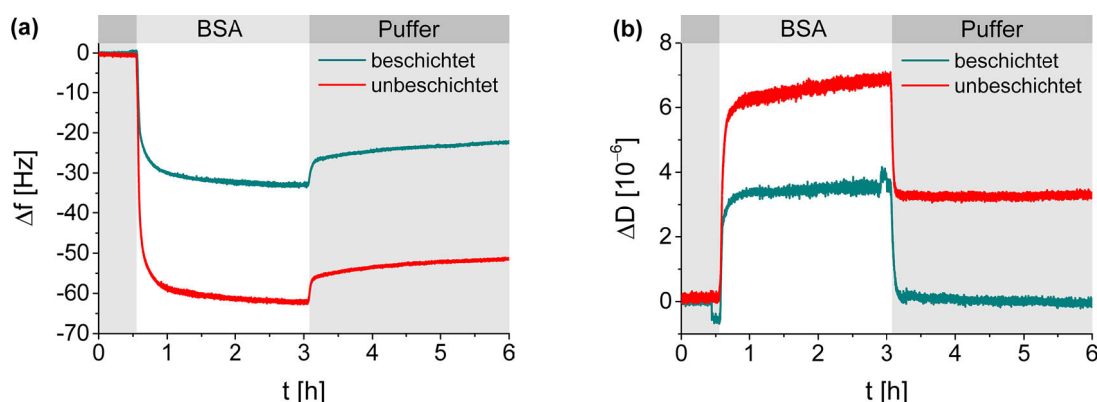


Abbildung 3.13. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf einer mit dem synthetischen Binder **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] beschichteten Titandioxid-Oberfläche im Vergleich zu einer unbeschichteten Oberfläche zur Untersuchung der Antifouling-Eigenschaften der Biokonjugat-Beschichtung: Frequenzverschiebungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: Die beschichtete sowie die unbehandelte Oberfläche wurden jeweils mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit einer BSA-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg·mL⁻¹ in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Die Dämpfungseigenschaften des auf der beschichteten Oberfläche gebildeten Proteinfilms konnten ebenfalls mit denen der BSA-Adsorption auf unbehandeltem TiO₂ verglichen werden (vgl. **Abbildung 3.13b**). Die Proteinanbindung auf der unbeschichteten Materialoberfläche bewirkte eine sehr hohe Dissipationsänderung von $6.9 \cdot 10^{-6}$ während der Inkubationsphase, welche im anschließenden Spülschritt wiederum abrupt auf Werte von $3.3 \cdot 10^{-6}$ verringert wurde. Der rasche Dissipationsabfall wies auf eine strukturelle Umgestaltung der auf der Oberfläche gebundenen Proteinmoleküle hin sowie auf eine Veränderung von einer viskoelastischen Schicht von BSA-Molekülen zu einem rigideren Film. Dieses Verhalten ist charakteristisch für die Adsorption höherer Konzentrationen des konformell flexiblen Proteins^[310] auf hydrophoben Oberflächen.^[313-315] Auch für die Biokonjugat-Beschichtung konnte während der Inkubation mit BSA eine erhöhte Viskoelastizität verzeichnet werden. Aufgrund der reduzierten Interaktionen des Proteins mit der Oberfläche war die Dissipationsänderung mit $3.5 \cdot 10^{-6}$ im Vergleich zu unbehandeltem TiO₂ jedoch deutlich geringer und kehrte im nachfolgenden Spülschritt zu dem initialen Wert zurück. Daraus lässt sich ableiten, dass die nach der Inkubationsphase gebundenen BSA-Moleküle den Schwingungen des Systems folgten und demnach nur geringe Auswirkungen auf die viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtung hatten.

Das Adsorptionsverhalten von BSA gegenüber mit dem synthetischen Binder **G-TBP-PEG^{CHEM}** beschichtetem TiO₂ zeigte, dass die unspezifischen Wechselwirkungen des globulären Proteins mit der Oberfläche nicht vollständig unterbunden werden konnten. Demnach sind die adhäsiven Eigenschaften von **TBP** in Form einer einfachen Verknüpfung des Peptides mit Poly(ethylenglycol) für potentielle Antifouling-Anwendungen nicht ausreichend. Durch das Einbeziehen der Adhäsionsdomäne **TBP** als mehrfache Wiederholungseinheit in eine

PEGylierte Struktur besteht die Möglichkeit, die Oberflächenhaftung zu verstärken und die Antifouling-Eigenschaften des Biokonjugat-Systems zu verbessern. Somit sollte der konzeptionelle Ansatz der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten effektiver umgesetzt werden können, um proteinresistente Beschichtungen zu erzeugen.

3.1.6 ADSORPTIONSVERHALTEN DIVALENTER PEPTID-PEG-KONJUGATE

Durch multiple Wiederholungseinheiten einer Adhäsionsdomäne können die Wechselwirkungen eines Systems mit anorganischen Oberflächen intensiviert werden.^[316] Wie bereits in **Kapitel 2.6.1** (vgl. Seite 21) beschrieben, nutzte der Arbeitskreis GRINSTAFF das Konzept der Multivalenz erfolgreich zur Verbesserung der biospezifischen und bioinerten Eigenschaften von Biokonjugat-Beschichtungen.^[203] Daher sollte dieses grundlegende Prinzip auf die enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Biokonjugaten übertragen werden. An Hand divalenter Strukturen der PEGylierten Adhäsionsdomäne **TBP** sollte die verstärkte Oberflächenhaftung sowie die Antifouling-Eigenschaften der entsprechenden Beschichtungen geprüft werden. Dafür wurden sowohl ein lineares Dimer $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$ als auch eine verzweigte Architektur $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ auf Basis der inversen Konjugationsstrategie unter Verwendung eines TentaGel® PAP Harzes ($M_{n,\text{PEG}} = 3.2 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) hergestellt. **Abbildung 3.14** zeigt schematisch die beiden divalente Systeme $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$ und $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ im Vergleich zu der Struktur des linearen Unimeres $\text{G-TBP-PEG}^{\text{CHEM}}$. Das Einbeziehen der nicht orthogonal geschützten Aminosäure Fmoc-Lysin(Fmoc)-OH in die festphasengebundene Peptidsynthese ermöglichte es, die verzweigten Adhäsionsdomänen elegant in das divalente Biokonjugat $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ zu integrieren. Die beiden Hybridmakromoleküle entsprechen den jeweiligen synthetischen Analoga hervorgehend aus der enzymatischen Aktivierung potentiell nicht-bindender Dimer-Substrate mit linearen bzw. verzweigten Peptidketten.

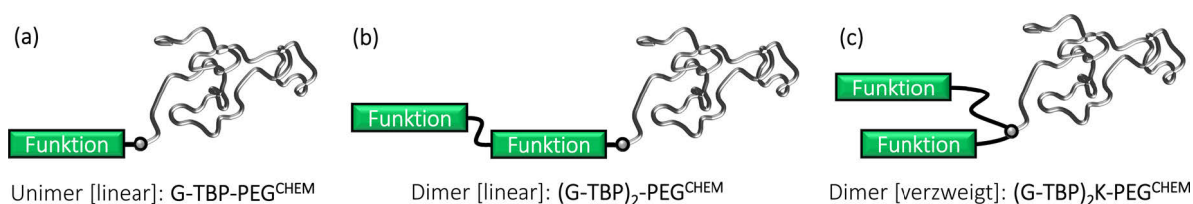


Abbildung 3.14. Schematische Darstellung der divalenter Systeme der PEGylierten Adhäsionsdomäne **TBP** zur Verstärkung der Oberflächenhaftung im Vergleich zu der Struktur des linearen Unimeres $\text{G-TBP-PEG}^{\text{CHEM}}$ (a); Lineares Dimer $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$ (b) und verzweigtes Dimer $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ (c).

Das Adsorptions- und Desorptionsverhalten der divalente Biokonjugate auf Titandioxid-Oberflächen wurde erneut durch QCM-D-Messungen ermittelt (vgl. **Abbildung 3.15**). Dabei zeigte sich sowohl für das lineare Dimer $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$ als auch für die verzweigte Struktur $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ ein rascher Frequenzabfall in den ersten 3 Minuten, wobei etwa 78 % bzw. 77 % der Beschichtung erzielt wurden. Während der Inkubationsphase konnten im Gleichgewichtszustand zwischen adsorbierenden und desorbierenden Molekülen Frequenzänderungen von bis zu -41 Hz für $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$ und -47 Hz für $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ verzeichnet werden. Im Vergleich dazu erreichte das lineare Unimer $\text{G-TBP-PEG}^{\text{CHEM}}$ eine

geringere Massenanlagerung von etwa 71 % in den ersten 3 Minuten sowie eine verminderte Frequenzverschiebung von -35 Hz im Sättigungsbereich. Folglich konnte durch die zweifache Integration der Adhäsionsdomäne **TBP** die Massenanlagerung um bis zu 15 % für die lineare Architektur und um bis 26 % für die verzweigte Struktur erhöht werden. Darüber hinaus stabilisierte der verzweigte Binder **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** die finale Beschichtung auf der Metalloxid-Oberfläche. Dies zeigte sich durch eine verminderte Reversibilität des adsorbierten Materials während des Spülschrittes um 15 %, wohingegen der Massenverlust für die linearen Systeme auf etwa 20 % beziffert werden konnte.

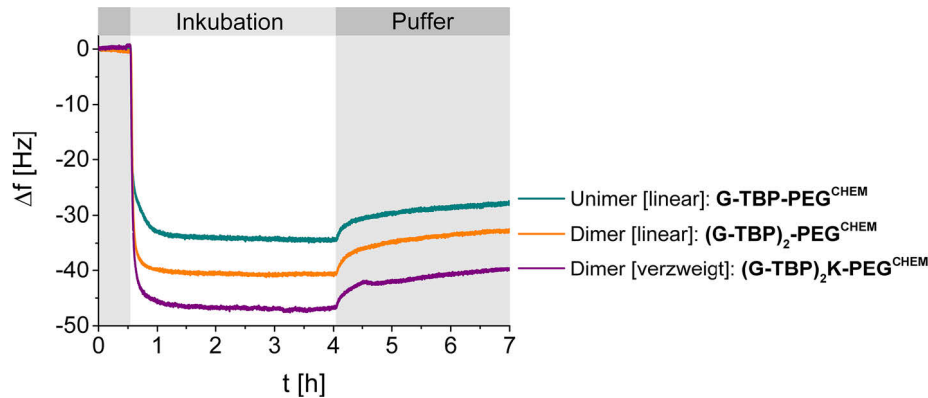


Abbildung 3.15. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der divalenten Biokonjugate **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** (8.0 μ M) und **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** (8.0 μ M) im Vergleich zu der Frequenzverschiebung des linearen Unimers **G-TBP-PEG^{CHEM}** (11.2 μ M). Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Biokonjugat-Lösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Die erhöhte Adsorption des verzweigten Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** im Vergleich zum linearen Dimer **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** wurde erwartet und konnte durch die strukturell bedingten Haftungseigenschaften der Adhäsionsdomäne **TBP** erklärt werden. Wie bereits im Zusammenhang mit der Entwicklung geeigneter Suppressionsdomänen für das unimere **G-TBP-PEG^{CHEM}** diskutiert, ist vornehmlich das N-terminale Hexamer RKLPGA für die spezifischen Wechselwirkungen mit TiO₂ entscheidend (vgl. **Kapitel 3.1.1** Seite 29). Durch die verzweigte Architektur der Peptidketten des Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** konnten die adhäsiven Sequenzabschnitte analog zur unimeren Biokonjugat-Struktur **G-TBP-PEG^{CHEM}** ungehindert mit der Metalloxid-Oberfläche interagieren. Die Haftungseigenschaften des linearen Dimer-Binders **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** dahingegen wurden aufgrund der nacheinander angeordneten Adhäsionsdomänen leicht vermindert. Das Bindungsmotiv **TBP6** der C-terminalen Einheit konnte durch die N-terminal folgende Peptiddomäne nicht mehr uneingeschränkt mit TiO₂ wechselwirken, weshalb die Materialanreicherung von **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** verglichen mit der des verzweigten Biokonjugates **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** um bis zu 13 % verringert war. Ebenso könnten entropische Effekte die Oberflächenhaftung von **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** infolge der limitierten strukturellen Flexibilität der verzweigten Peptidketten begünstigt haben. Des Weiteren wurde vermutet, dass der räumliche Anspruch des linearen Dimeres gegenüber dem des verzweigten Binders erhöht war und so weniger Moleküle auf der Oberfläche angelagert werden konnten. Darüber hinaus konnte der Materialaufwand des verzweigten Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** zur Beschichtung der Oberfläche im Vergleich zum linearen Unimer **G-TBP-PEG^{CHEM}** verringert werden, ohne

dass die Adsorptionskinetik des Biokonjugates nachteilig beeinflusst wurde. Die divalenten Systeme wurden mit Konzentrationen von $8.0 \mu\text{M}$ vermessen, wohingegen die Inkubation des Unimeres mit einer Lösung von $11.2 \mu\text{M}$ durchgeführt wurde. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches bewirken geringere Substanzmengen keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Adsorptionsverhaltens starker Binder auf TiO_2 . So konnte für die verzweigte Struktur **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** erst unterhalb einer Konzentration von $5.5 \mu\text{M}$ die während der Inkubationsphase angestrebte Oberflächensättigung nicht mehr erreicht werden. Dieser Sachverhalt konnte im Zusammenhang mit konzentrationsabhängigen Messungen zur Bestimmung der scheinbaren Affinitätskonstante K_A nach dem LANGMUIR'schen Adsorptionsmodell belegt werden (vgl. **Kapitel 3.1.9** Seite 63).

Die verstärkte Oberflächenhaftung der divalenten Peptid-PEG-Konjugate **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** und **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** konnte mithilfe der adsorbierten Massen nach den Modellen von SAUERBREY^[243] und VOIGT^[249-251] ebenfalls veranschaulicht werden (vgl. **Tabelle 3.5**). Aufgrund der Unterbewertung der adsorbierten Massen viskoelastischer Beschichtungen^[249] wie der der Biokonjugate durch das SAUERBREY-Modell werden im Folgenden lediglich die Werte nach VOIGT diskutiert. Die berechneten Schichtdicken und Massen ergaben für das lineare Dimer **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** eine erhöhte Materialanreicherung von 13 % mit $d_{\text{VOIGT}} = 6.3 \pm 0.2 \text{ nm}$ bzw. $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 876 \pm 36 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ im Vergleich zur unimeren Struktur **G-TBP-PEG^{CHEM}** mit Werten $d_{\text{VOIGT}} = 5.5 \pm 0.4 \text{ nm}$ bzw. $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 660 \pm 48 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. Für die Beschichtung des verzweigten Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** konnte eine abermals höhere Massenanlagerung um etwa 25 % mit $d_{\text{VOIGT}} = 7.3 \pm 0.3 \text{ nm}$ bzw. $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 876 \pm 36 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ verzeichnet werden. Somit zeigte die nach dem VOIGT-Modell ermittelte Massenzunahme eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit der Interpretation der erhöhten Massenadsorption der divalenten Binder an Hand der erzielten Frequenzverschiebungen. Aus den ermittelten Schichtdicken im Bereich von $6.3 - 7.3 \text{ nm}$ lässt sich ableiten, dass die Beschichtungen der dimeren Systeme zur Ausbildung von Monolagen führten und die langkettigen PEG-Makromoleküle pilzartige Konformationen auf der Metalloxid-Oberfläche annehmen.^[296]

Tabelle 3.5. Adsorbierte Massen und Schichtdicken nach VOIGT^[249-251] unter Berücksichtigung der Dämpfungseigenschaften der viskoelastischen Beschichtungen des linearen Unimeres **G-TBP-PEG^{CHEM}** im Vergleich zu den Massenanlagerungen der divalenten Biokonjugate **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** und **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}**. Zusätzlich wurden für die Systeme die adsorbierten Massen nach dem SAUERBREY-Modell^[243] bestimmt.

QCM-D-Experiment	VOIGT:		SAUERBREY: $\Delta m \text{ [ng}\cdot\text{cm}^{-2}]$				
	d [nm]	$\Delta m \text{ [ng}\cdot\text{cm}^{-2}]$	\emptyset	n = 3	n = 5	n = 7	n = 9
Unimer [linear]: G-TBP-PEG^{CHEM}	5.5 ± 0.4	660 ± 48	547 ± 43	604	554	527	504
Dimer [linear]: (G-TBP)₂-PEG^{CHEM}	6.3 ± 0.2	756 ± 24	660 ± 41	714	670	635	622
Dimer [verzweigt]: (G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}	7.3 ± 0.3	876 ± 36	777 ± 36	822	786	764	737

Die Interpretation der Frequenz- und Dissipationsänderungen erfolgte durch die in der Software QTools hinterlegten physikalischen Modelle von SAUERBREY und VOIGT (vgl. **Kapitel 5.3.3.3** bzw. **Kapitel 5.3.3.4** Seite 114).

Durch die Auftragung der Dissipationsänderungen gegenüber den Frequenzverschiebungen konnten die viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtungen der mono- und divalenten

Biokonjugate direkt miteinander verglichen werden (vgl. **Abbildung 3.16**). Hier zeigte sich für die adhäsiven Systeme der charakteristische hyperbolische Verlauf hinsichtlich der Dämpfungseigenschaften in Abhängigkeit von den Massenlagerungen auf Titandioxid-Oberflächen. Die initiale Adsorption der Biokonjugate bewirkte zunächst einen Anstieg der Dissipationen, welche zum Ende der Inkubationsphase geringfügig abnahmen. Die leicht verminderten Viskoelastizitäten der Beschichtungen im Bereich des Sättigungsgleichgewichtes ist durch eine mit zunehmender Oberflächenbedeckung verringerte Bewegungsfreiheit der adhärenierten Moleküle zu erklären.^[289, 293, 294] Interessanterweise konnte sowohl für das lineare Unimer **G-TBP-PEG^{CHEM}** als auch die verzweigte Dimer-Struktur **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** ein ähnlicher Anstieg des Verhältnisses von $\Delta D/\Delta f$ mit Dissipationsänderungen von bis zu $2.6 \cdot 10^{-6}$ verzeichnet werden. Dagegen bewirkte die Oberflächenhaftung des linearen Dimeres **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** einen flacheren Anstieg für ΔD gegenüber Δf mit geringeren Dissipationsänderungen von maximal $2.3 \cdot 10^{-6}$. Dabei nahmen die Dissipationswerte bei höheren Frequenzverschiebungen stärker ab als die des linearen Unimeres **G-TBP-PEG^{CHEM}** und des verzweigten Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}**. Demnach konnten die entsprechenden Beschichtungen mit einer flexibleren Konformation der auf der Oberfläche gebundenen Biokonjugat-Moleküle assoziiert werden, wohingegen die Massenlagerung des linearen Dimer-Binders **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** zur Ausbildung eines weniger viskoelastischen Films auf TiO₂ führte.^[291, 292]

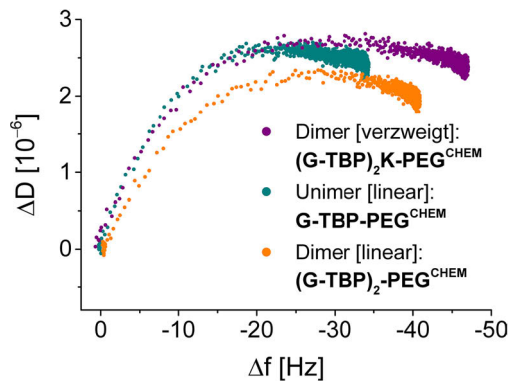


Abbildung 3.16. Auftragung der Dissipationsänderungen gegenüber den Frequenzverschiebungen zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtungen der divalenten Biokonjugate **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** und **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** im Vergleich zu dem Verhältnis $\Delta D/\Delta f$ des linearen Unimeres **G-TBP-PEG^{CHEM}**.

Durch das Einbeziehen der Adhäsionsdomäne **TBP** als zweifache Wiederholungseinheit in lineare und verzweigte Biokonjugat-Strukturen konnte die Massenlagerung auf Titandioxid-Oberflächen gegenüber dem monovalenten Binder erhöht werden. Daraus hervorgehend waren weitere Schritte für eine erfolgreiche Umsetzung der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Biokonjugaten erforderlich, um proteinresistente Beschichtungen für die Metalloxyd-Oberfläche erzeugen zu können. Zum einen sollte die Leistungsfähigkeit der für das lineare Unimer evaluierten Suppressionsdomäne zur Unterdrückung der adhäsiven Eigenschaften der starken divalenten Binder bewertet werden. Bedingt durch die lineare Anordnung der beiden Adhäsionsdomänen in **(G-TBP)₂-PEG^{CHEM}** wurde angenommen, dass die potentiell haftungsunterbindende Einheit nicht ausreichend Einfluss auf die Oberflächenwechselwirkungen der C-terminal positionierten Bindungsdomäne **TBP** nehmen kann. Daher wurde die Wirksamkeit

der Suppressionsdomäne für die verzweigte Biokonjugat-Struktur $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ als deutlich höher bemessen, um einen nicht-bindenden Vorläufer zu erhalten. Darüber hinaus hatte sich der synthetische Binder $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ hinsichtlich der Oberflächenhaftung und der Stabilität der gebildeten Beschichtung gegenüber dem linearen Dimer als überlegen erwiesen. Zum anderen sollten erneut enzymkinetische Untersuchungen durchgeführt werden, um die Effizienz der TEV Protease hinsichtlich der Prozessierung eines geeigneten nicht-bindenden Dimer-Substrates zu evaluieren. Zunächst sollte jedoch geprüft werden, inwiefern die verstärkte Oberflächenaffinität des verzweigten Peptid-PEG-Konjugates die Antifouling-Eigenschaften im Vergleich zur Unimer-Beschichtung verbessern konnte.

3.1.7 ANTIFOULING-EIGENSCHAFTEN DER DIMER-BESCHICHTUNG

Zur Untersuchung der Antifouling-Eigenschaften des verzweigten Binders $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ wurde die Stabilität der Dimer-Beschichtung gegenüber der Adsorption von BSA mit der Oberflächenaffinität des Modellproteins auf einer unbeschichteten Titandioxid-Oberfläche verglichen (vgl. **Abbildung 3.17a**). Für die BSA-Inkubation des nicht behandelten Materials hatte sich die unspezifische Oberflächenhaftung des Serumproteins durch eine Frequenzverschiebung von -62 Hz während der Inkubationsphase gezeigt. Der anschließende Spülschritt hatte die Ausbildung eines irreversiblen Proteinfilms auf der Oberfläche ergeben.

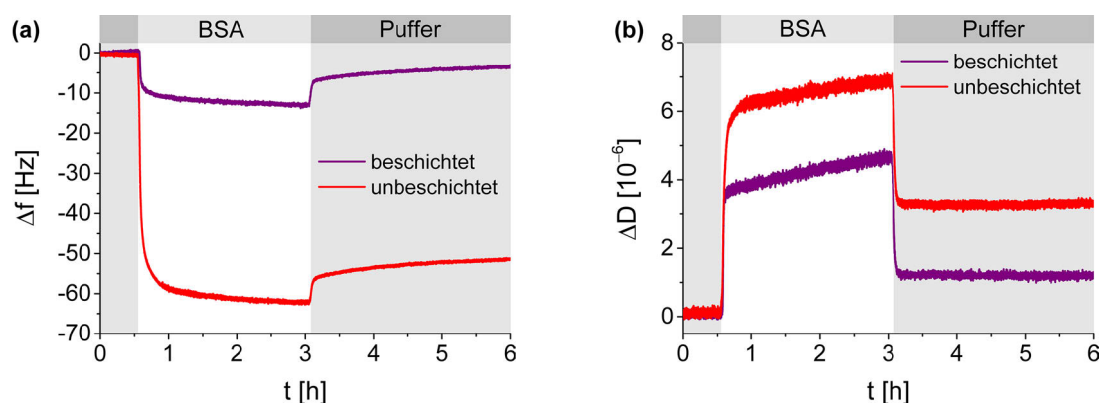


Abbildung 3.17. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf einer mit dem synthetischen Dimer-Binder $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ beschichteten Titandioxid-Oberfläche im Vergleich zu einer unbeschichteten Oberfläche zur Untersuchung der Antifouling-Eigenschaften der Biokonjugat-Beschichtung: Frequenzverschiebungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: Die Biokonjugat-Beschichtung sowie die unbeschichtete Oberfläche wurden jeweils mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit einer BSA-Lösung mit einer Konzentration von $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Demgegenüber bewirkte die Biokonjugat-Beschichtung eine signifikante Reduktion der Proteinwechselwirkungen um etwa 79 % entsprechend der Frequenzänderung von -13 Hz während der Inkubationsphase. Im nachfolgenden Spülschritt wurde die Reversibilität der Interaktionen zwischen BSA und der Metalloxid-Oberfläche deutlich, wobei die Proteinadsorption mit einer finalen Frequenzverschiebung von -4 Hz auf etwa 92 % verringert werden konnte. Folglich bewirkte die Beschichtung des verzweigten Dimer-Binders eine entscheidende Verbesserung

der Antifouling-Eigenschaften um etwa 35 % im Vergleich zu dem durch das lineare Unimer **G-TBP-PEG^{CHEM}** gebildeten Films (vgl. **Kapitel 3.1.5** Seite 53). Dieses Resultat verdeutlichte die Effektivität divalenter Adhäsionsdomänen zur Erhöhung der Oberflächenhaftung eines Systems und der Ausbildung einer proteinresistenten Beschichtung durch eine verzweigte Biokonjugat-Struktur.

An Hand der Dissipationsänderungen konnten die verminderten Wechselwirkungen des globulären Proteins mit der nicht-kovalent PEGylierten Metalloxid-Oberfläche ebenfalls nachvollzogen werden (vgl. **Abbildung 3.17b**). Die divalente Beschichtung von **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** konnte die durch die BSA-Adsorption bedingten viskoelastischen Eigenschaften des Systems signifikant vermindern. Im Vergleich zu unbehandeltem TiO₂ wurde die Dissipationsänderung während der Inkubationsphase von $6.9 \cdot 10^{-6}$ auf $4.7 \cdot 10^{-6}$ verringert. Im anschließenden Spülschritt erfolgte eine schnelle strukturelle Umgestaltung der auf der Oberfläche gebundenen Moleküle entsprechend des raschen Dissipationsabfalles auf $3.3 \cdot 10^{-6}$ für das unbehandelte Material sowie auf $1.2 \cdot 10^{-6}$ für die Biokonjugat-Beschichtung.^[313-315]

Die verbesserten Antifouling-Eigenschaften des verzweigten Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** bildeten den Ausgangspunkt für eine erfolgreiche Umsetzung der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten als proteinresistente Beschichtungen. Dementsprechend war es erforderlich, die ausgeprägte Oberflächenhaftung des divalenten Binders mittels geeigneter Suppressionsdomänen zu unterbinden, um durch proteolytische Abtrennung dieser die adhäsiven Eigenschaften des Biokonjugates zurückbilden zu können.

3.1.8 UNTERDRÜCKUNG DER ADHÄSIVEN EIGENSCHAFTEN DES VERZWEIGTEN DIMERES

Durch Adsorptionsexperimente mittels QCM-D konnten verschiedene anionische und neutrale Suppressionsdomänen zur Unterdrückung der Oberflächenhaftung des monovalenten Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** identifiziert werden (vgl. **Kapitel 3.1.1** Seite 29). Dabei erwies sich eine zweifache Modifikation des adhäsiven Biokonjugates mit Glutaminsäure in Form von Ac-(EG)₂ als besonders effizient und ergab den nicht-bindenden Vorläufer **S4-PEG**. Daher sollte die negativ geladene Suppressionsdomäne auf deren Eignung untersucht werden, die Oberflächenhaftung des verzweigten Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** unterbinden zu können. Wie schon bei dem enzymresponsiven **S4-PEG** wurde zwischen der potentiell haftungsunterdrückenden Einheit und der Adhäsionsdomäne **TBP** die Erkennungssequenz der TEV Protease ENLYFQ↓G eingeführt, um den divalenten Binder bei Bedarf enzymatisch zurückbilden zu können. In **Abbildung 3.18a** sind die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des entsprechend modifizierten Biokonjugates **(S4)₂K-PEG** in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) den Frequenzverschiebungen von **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** gegenübergestellt.^[267] So konnte für das anionische Dimer **(S4)₂K-PEG** während der Inkubationsphase eine Frequenzänderung von -13 Hz verzeichnet werden. Obwohl gemessen an dieser Frequenzverschiebung eine Reversibilität des adsorbierten Materials von etwa 31 % im anschließenden Spülschritt beobachtet wurde, konnte die gebildete Beschichtung nicht in vollem Umfang von der Metalloxid-Oberfläche abgelöst werden und resultierte in einer finalen Frequenzänderung von -9 Hz. Folglich bewirkten die eingeführten Suppressionsdomänen eine unvollständige Unterdrückung der starken adhäsiven

Eigenschaften des verzweigten Binders $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$. Jedoch konnte die Massenanlage-
 rung des Dimeres – entsprechend der von $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ erzielten Frequenzänderung
 von -47 Hz während der Inkubationsphase – durch die Suppressionsdomänen um bis zu etwa
 72 % verringert werden. Dieses Resultat war vor allem deshalb interessant, da durch die
 eingeführten Glutaminsäure-Seitenketten der Ladungszustand des verzweigten Dimeres von
 etwa $+4$ auf -4 analog zu den Nettoladungen des unimeren Systems gänzlich umgekehrt
 wurde (vgl. **Abbildung 3.18c**). Die Invertierung der Nettoladung des monovalenten Binders
 $\text{G-TBP-PEG}^{\text{CHEM}}$ von $+2$ auf -2 führte zuvor zu dem nicht-bindenden Peptid-PEG-Konjugat
 S4-PEG (vgl. **Abbildung 3.18b** bzw. **Abbildung 3.18c**).

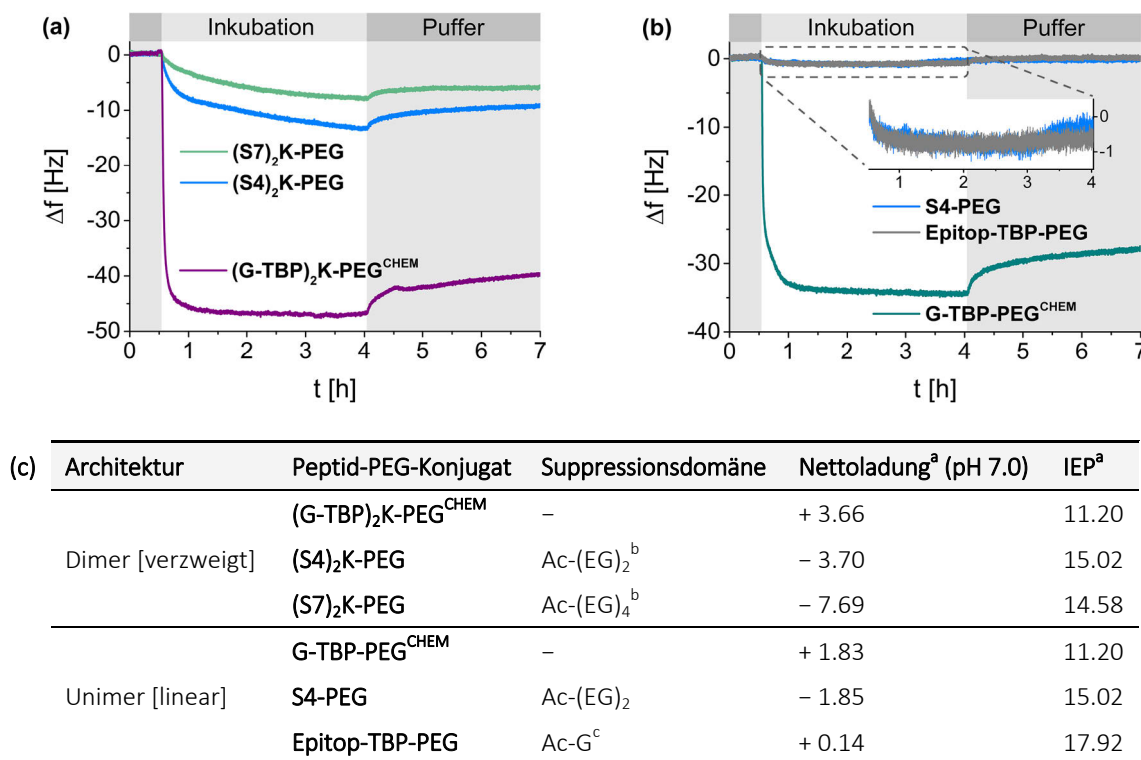


Abbildung 3.18. Zusammenhang zwischen dem Adsorptionsverhalten, der Architektur und dem Ladungszustand bindender und mit Suppressionsdomänen modifizierter Peptid-PEG-Konjugate: Adsorptions- und Desorptionsisothermen der verzweigten Dimere $(\text{S4})_2\text{K-PEG}$ und $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ sowie des korrespondierenden synthetischen Dimer-Binders $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ (a) im Vergleich zu den Frequenzverschiebungen des linearen Unimeres S4-PEG und des monovalenten Binders $\text{G-TBP-PEG}^{\text{CHEM}}$ sowie der Referenz Epitop-TBP-PEG (b). Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Biokonjugat-Lösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült. Tabellarischer Überblick zu den Nettoladungen bei pH 7.0 und IEPs der Systeme (c). ^a Berechnung mittels SEDNTERP.^[268] ^b Suppressionsdomäne an beiden N-Termini. ^c Modifikation zur Ladungskompensation der N-terminalen Aminofunktion.

Im Zusammenhang mit der Identifizierung geeigneter Suppressionsdomänen für das unimere System war zusätzlich das Adsorptionsverhalten einer unimeren Referenz Epitop-TBP-PEG untersucht worden. Die Peptidsequenz des linearen Biokonjugates wies neben der Adhäsionsdomäne **TBP** und dem Epitop ENLYFQ↓G der TEV Protease N-terminal nur die acetylierte Aminosäure Glycin auf (vgl. **Abbildung 3.18c**). Durch eine QCM-D-Messung in Phosphat-Puffer sollte ermittelt werden, inwiefern die Erkennungssequenz die adhäsiven Eigenschaften von **TBP** beeinflusste. Die Inkubation mit Epitop-TBP-PEG ergab eine vernachlässigbare

Frequenzverschiebung von etwa -1 Hz nach 3.5 Stunden (vgl. **Abbildung 3.18b**). Im nachfolgenden Spülschritt konnten die minimal haftenden Moleküle vollständig von der Oberfläche abgetragen werden. Somit schien die enzymespezifische Erkennungssequenz, welche zur Entfernung der anionischen Suppressionsdomäne Ac-(EG)₂ von **S4-PEG** integriert wurde, entscheidend zur Unterdrückung der Oberflächenhaftung des Bindungsmotives von **TBP** beizutragen. Dabei wurde angenommen, dass durch die überwiegend hydrophoben und ungeladenen Aminosäuren des Epitopes ENLYFQ↓G – mit Ausnahme von E – sowie dessen starre Sekundärstruktur die Wechselwirkungen mit TiO₂ unterbunden wurden. Die Oberflächenaffinität des verzweigten Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** war jedoch deutlich höher als die des monovalenten **G-TBP-PEG^{CHEM}**. Folglich war das Zusammenwirken der anionischen Suppressionsdomänen und der hydrophoben Erkennungssequenz der TEV Protease nicht mehr ausreichend, um die adhäsiven Eigenschaften des divalenten Systems vollständig zu unterdrücken.

Zur Verbesserung des haftungsvermindernden Effektes der anionischen Aminosäuren wurden die Suppressionsdomänen des verzweigten Biokonjugates um zwei weitere Einheiten EG ergänzt. Somit wurde die negative Nettoladung des daraus resultierenden Dimeres **(S7)₂K-PEG** im Vergleich zu **(S4)₂K-PEG** auf etwa -8 verdoppelt (vgl. **Abbildung 3.18c**). Dies führte zu reduzierten Wechselwirkungen mit der Metalloxid-Oberfläche gegenüber dem divalenten Binder **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** um etwa 83 % gemessen an der Frequenzänderung von -9 Hz während der Inkubationsphase (vgl. **Abbildung 3.18a**).^[267] Die leichte Reversibilität des adsorbierten Materials resultierte in einer verminderten Frequenzverschiebung von -6 Hz im nachfolgenden Spülschritt. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Unterdrückung der adhäsiven Eigenschaften der divalenten Bindungsmotive nicht ausschließlich auf die elektrostatische Abstoßung durch das hydrophobe Epitop der TEV Protease zurückzuführen ist.

Auch wenn die Oberflächenhaftung des verzweigten Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** durch die Verlängerung der Suppressionsdomäne um zwei weitere EG-Einheiten nicht vollständig unterbunden werden konnte, ist der Unterschied hinsichtlich des Adsorptionsverhaltens zu Beginn der Inkubationsphase von **(S7)₂K-PEG** gegenüber dem des divalenten Binders signifikant. Das schwach-bindende Dimer adsorbierte nur sehr langsam auf der Metalloxid-Oberfläche, wohingegen für den Binder **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** eine schnelle initiale Materialanreicherung verzeichnet wurde. Für eine Optimierung der Inkubationsbedingungen bieten sich konzentrationsabhängige QCM-D-Messungen zur Bestimmung der scheinbaren Affinitätskonstante K_A nach dem LANGMUIR'schen Adsorptionsmodell an.

3.1.9 CHARAKTERISIERUNG DER MOLEKULAREN BINDUNG NACH LANGMUIR

Neben der Beschreibung des Adsorptionsverhaltens von Biokonjugaten an Hand der Frequenz- und Dissipationsänderungen sowie der Bestimmung der adsorbierten Massen und Schichtdicken nach SAUERBREY und VOIGT kann mittels der erzielten Frequenzverschiebungen die molekulare Bindung eines adhäsiven Systems charakterisiert werden. Dabei können die Adsorptionsisothermen durch einer Reihe empirischer Modelle interpretiert werden.^[317] Eine einfache, etablierte Methode beruht auf der Auswertung der Frequenzänderungen im Gleichgewichtszustand in Abhängigkeit von der Konzentration des Adsorbates nach LANGMUIR.^[318]

Im Zuge dessen kann die für eine zügige Oberflächensättigung maximal notwendige Konzentration ermittelt werden, welche eine Verringerung des Materialaufwandes und der Inkubationszeit ermöglicht. Unter der Bedingung, dass die Adsorption einer Verbindung zur Ausbildung einer Monolage führt, alle Bindungsstellen auf der Oberfläche energetisch gleichwertig sind und die adsorbierten Moleküle untereinander nicht wechselwirken,^[319] kann das LANGMUIR'sche Adsorptionsmodell durch **Gleichung 5** wiedergegeben werden:^[318]

$$\Delta f_{max} = \Delta f_{eq} \cdot \frac{K_A \cdot c}{1 + K_A \cdot c} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Δf_{max} entspricht der maximal erzielten Frequenzänderung einer definierten Biokonjugat-Konzentration, Δf_{eq} der Frequenzverschiebung im Gleichgewichtszustand, c der eigentlichen Konzentration des Biokonjugates in Lösung und K_A [M⁻¹] der scheinbaren Affinitätskonstante. Hierbei ist zu beachten, dass die beschriebene Konstante K_A eine vereinfachte Näherung der Gleichgewichtsaffinitätskonstante K_{eq} darstellt, welche aus den Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation und Dissoziation hervorgeht.^[320] Für die mathematische Interpretation der Resonanzfrequenzen Δf_{max} kann die **Gleichung 5** auf Basis der reziproken Auftragung nach SCATCHARD in eine linearisierte Form überführt werden (**Gleichung 6**):^[318]

$$\frac{c}{\Delta f_{max}} = \frac{c}{\Delta f_{eq}} + \frac{1}{\Delta f_{eq}} \cdot \frac{1}{K_A} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Eine entsprechende Umformung der **Gleichung 5** ermöglicht eine Auftragung von $-c/\Delta f_{max}$ gegenüber der Biokonjugat-Konzentration c , so dass aus dem Quotienten aus Anstieg und Achsenschnittpunkt die scheinbare Affinitätskonstante K_A erhalten wird.^[318]

Zur Berechnung der Konstante K_A wurde die Adsorption verschiedener Konzentrationen des verzweigten Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** zwischen 0.1 µM und 5.5 µM dreifach vermessen und die maximal erzielten Frequenzänderungen Δf_{max} zu einem definierten Zeitpunkt bestimmt. **Abbildung 3.19a** zeigt exemplarisch die Adsorptionsisothermen einer repräsentativen Messreihe in Abhängigkeit von der Konzentration des synthetischen Binders in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0). Dabei konnte für die Biokonjugat-Lösung mit einer Konzentration von 5.5 µM die Einstellung des Sättigungsgleichgewichtes zwischen Adsorption und Desorption innerhalb von 40 Minuten verzeichnet werden. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wurde einer finalen Frequenzverschiebung Δf_{max} von – 43 Hz erzielt. Mit abnehmender Konzentration verringerten sich die maximalen Resonanzfrequenzen entsprechend auf Frequenzänderungen von unter – 6 Hz für 0.1 µM **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}**. Unterhalb dieser Konzentration wurde für den divalenten Binder keine Materialanreicherung auf der Metalloxid-Oberfläche beobachtet (vgl. **Kapitel 5.7.8** Seite 156). Die Auftragung der gemittelten Werte des Quotienten $-c/\Delta f_{max}$ gegenüber der Konzentration c ermöglichte durch das Anlegen einer linearen Ausgleichsgerade die Bestimmung der scheinbaren Affinitätskonstante des Dimer-Binders mit $K_A = 1.60 \pm 0.75 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (vgl. **Abbildung 3.19b**). Diese liegt in der gleichen Größenordnung wie die Konstante eines durch Tyrosinase aktivierten Biokonjugates mit $K_A = 1.63 \pm 0.32 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.^[24] Die Oberflächenhaftung des Systems beruhte auf enzymatisch generierten L-Dopa-Motiven. Der

Arbeitskreis BÖRNER verwendete den starken Binder als proteinresistente Beschichtung für Aluminiumoxid-Oberflächen gegenüber dem Modellprotein BSA und reinem Humanserum.

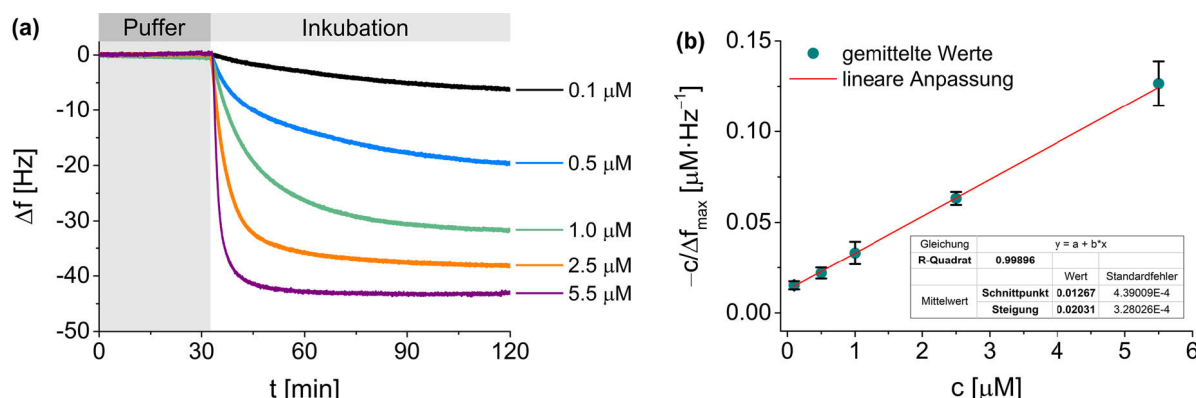


Abbildung 3.19. LANGMUIR-Adsorptionsisothermen des synthetischen Dimer-Binders $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ in Abhängigkeit von der Konzentration (a). Auftragung von $-c/\Delta f_{\max}$ gegenüber der Konzentration c zur Bestimmung der scheinbaren Affinitätskonstante K_A nach LANGMUIR (b).^[318, 319] Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Biokonjugat-Lösung mit Konzentrationen zwischen 0.1 μM und 5.5 μM $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Durch die konzentrationsabhängigen QCM-D-Messungen zur Bestimmung der scheinbaren Affinitätskonstante nach dem LANGMUIR-Adsorptionsmodell konnte das divalente Peptid-PEG-Konjugat $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ als ein starker Binder für TiO_2 charakterisiert werden. Gleichzeitig konnte unter Verwendung einer geringeren Konzentration von 5.5 μM die Inkubationsphase auf 90 Minuten reduziert werden, ohne die Einstellung des Sättigungsgleichgewichtes oder die Stabilität der Beschichtung negativ zu beeinflussen.^[267] Dementsprechend konnte die für eine vollständige Oberflächenbedeckung notwendige Konzentration um 31 % vermindert und gegenüber dem unimeren Binder $\text{G-TBP-PEG}^{\text{CHEM}}$ mit 11.2 μM sogar halbiert werden. Aufgrund der verkürzten Inkubationszeit sowie der verringerten Mengen an Biokonjugat sollte die leichte Oberflächenhaftung des verzweigten Dimer-Substrates $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ bei der enzymatischen Aktivierung zu vernachlässigen sein. Somit konnten enzymkinetische Untersuchungen durchgeführt werden, um die Effizienz der TEV Protease hinsichtlich der Umsetzung hoher Mengen des nicht-aktivierten Substrates zu evaluieren.

3.1.10 ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG DES SCHWACH-BINDENDEN DIMERES

Ausgangspunkt für die Bestimmung des Substratumsatzes des enzymresponsiven $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ war die Reinheit des verzweigten Peptid-PEG-Konjugates, welche in Analogie zu dem monovalenten System von S4-PEG durch CNBr-Spaltung ermittelt wurde. Für das lineare Unimer hatte sich durch die qualitative Analyse der entstandenen Fragmente und die quantitative Auswertung der entsprechenden Signalflächen mittels RP-UHPLC-MS ergeben, dass die Peptidkomponente fehlerhafte Segmente beinhaltet. Infolgedessen wurde die Synthese für das verzweigte Dimer $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ optimiert, indem die automatisiert durchgeführten Kupplungszyklen ab dem 16. Kupplungsschritt manuell fortgesetzt wurden. Wie schon zuvor bei der Darstellung der monovalenten Biokonjugate erfolgten ab der 10. Aminosäure-Einheit Doppel-

kupplungen. Für das divalente Substrat **(S7)₂K-PEG** konnte an Hand der CNBr-Peptidfragmente eine Reinheit von etwa 67 % bestimmt werden (vgl. **Kapitel 5.5.16** Seite 134).^[267] Das mit zunehmender Kettenlänge vermehrte Auftreten von Abbruch- und Auslassungssequenzen konnte durch die verzweigte Architektur des Biokonjugates erklärt werden. Durch Verwendung von Fmoc-Lysin(Fmoc)-OH als Verzweigungspunkt in der festphasengebundenen Peptidsynthese wurden die Peptidsequenzen nach dem ersten Kupplungsschritt an zwei N-terminalen Aminofunktionen aufgebaut. Aufgrund der Nähe dieser zueinander sowie der verdoppelten Beladung des Harzes wurde die Tendenz der Peptidketten während der Synthese zu aggregieren erhöht.^[321, 322] Dies führte zu einer eingeschränkten Zugänglichkeit der beiden N-Termini für die zu kuppelnden Aminosäuren. Folglich wurden mit zunehmender Kettenlänge vor allem fehlerhafte Segmente im Bereich der Suppressionsdomänen nachgewiesen. Dies könnte auch erklären, weshalb die Oberflächenhaftung des synthetischen Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** nur unvollständig unterdrückt werden konnte. Ungeachtet dessen können fehlerhafte Peptidsequenzen, die nicht die Erkennungssequenz der TEV Protease betreffen, dennoch enzymatisch umgesetzt werden und zu Bildung des eigentlich relevanten Produktes **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** führen. Demnach sollte – vor einem materialwissenschaftlichen Anwendungsaspekt – die enzymatisch aktivierte Adsorption des verzweigten **(S7)₂K-PEG** zur Ausbildung einer proteinresistenten Beschichtung führen können.

Als Grundlage für die Prozessierung des schwach-bindenden Dimeres **(S7)₂K-PEG** diene das für das unimere Substrat **S4-PEG** erarbeitete Aktivierungsprotokoll (vgl. **Tabelle 3.2** Seite 34). Dabei wurde berücksichtigt, dass bei der verzweigten Struktur zwei Schnittstellen durch die TEV Protease adressiert werden mussten, um den entsprechenden Binder **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** enzymatisch freisetzen zu können. Folglich wurde die bisher verwendete Enzymkonzentration von 28 Units TEV Protease auf 56 Units verdoppelt, um eine maximale Proteolyseeffizienz zu gewährleisten. Für die Quantifizierung des Substratumsatzes des enzymresponsiven Dimeres **(S7)₂K-PEG** wurden erneut analytische RP-HPLC-Messungen nach einer entsprechenden Optimierung des Laufmittelgradienten herangezogen. Die Isolierung des mit der Zeit ansteigenden UV-Vis-Signals der abgespaltenen Suppressionsdomänen in Form der Peptidsequenz Ac-(EG)₄-ENLYFQ (**IF7^{ENZ}**) von den überlagerten Signalen des Eduktes **(S7)₂K-PEG** und des simultan entstehenden Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** ermöglichte eine indirekte Quantifizierung an Hand des chemischen Analogons **IF7^{CHEM}**.^[267]

Die katalytische Aktivität der viralen Cysteinprotease gegenüber dem verzweigten Substrat konnte zunächst qualitativ nachgewiesen werden. Dazu wurde die proteolytisch abgetrennte Suppressionsdomäne **IF7^{ENZ}** chromatographisch von den beiden Biokonjugaten separiert und mittels RP-UHPLC-MS analysiert. Das dazugehörige ESI-MS-Spektrum ergab die Entstehung von **IF7^{ENZ}** als die zweifach geladenen Addukt-Ionen $[M+2H]^{2+}$ und $[M+H+K]^{2+}$ bei m/z 800.6 bzw. 819.6 (vgl. **Abbildung 3.20a**). Neben den beiden intensiven Massensignalen konnten zwei weitere Signale geringerer Intensität bei m/z 736.2 bzw. 754.8 als die Addukt-Ionen $[M-E+2H]^{2+}$ bzw. $[M-E+H+K]^{2+}$ des Proteolyseproduktes der ersten Abbruchsequenz des enzymresponsiven Substrates **(S7)₂K-PEG** identifiziert werden. Eine detaillierte Zuordnung der weiteren Massensignale zu den jeweiligen Peptid-Spezies kann **Kapitel 5.6.2** (vgl. Seite 142) entnommen werden. Somit konnte die abgespaltene Suppressionsdomäne **IF7^{ENZ}** chromatographisch nicht in voll-

ständiger Reinheit isoliert werden. Dieses Ergebnis war nicht ungewöhnlich, da die Abtrennung eines Zilopeptides von den fehlerhaften Segmenten mittels RP-HPLC an einem Umkehrphasenmaterial durch die unterschiedliche Hydrophobizität der Peptidsequenzen bedingt wird und mit zunehmender Kettenlänge schwieriger wird.^[271] Folglich trug das proteolytisch gebildete Spaltprodukt der ersten Abbruchsequenz von (S7)₂K-PEG ebenfalls zur Signalfläche des zur Quantifizierung dienenden UV-Vis-Signales bei. Eine Bestimmung des entsprechenden Anteils war nicht möglich, da beide Spezies auch bei Verwendung der hochauflösenden Messtechnik der hochaufgelösten UHPLC nahezu zeitgleich eluiert wurden. Daher konnte der Beitrag des zusätzlichen Proteolyseproduktes zu der Signalfläche nicht in die Kalibrierung des synthetischen Analogons der Suppressionsdomäne IF7^{CHEM} miteinbezogen werden. Dieser Sachverhalt wurde bei der Bewertung der ermittelten Umsatzraten berücksichtigt. Dennoch erlaubte der materialwissenschaftliche Ansatz des Konzeptes der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten eine Einschätzung der katalytischen Effizienz der TEV Protease hinsichtlich der Prozessierung hoher Mengen des verzweigten Dimer-Substrates.

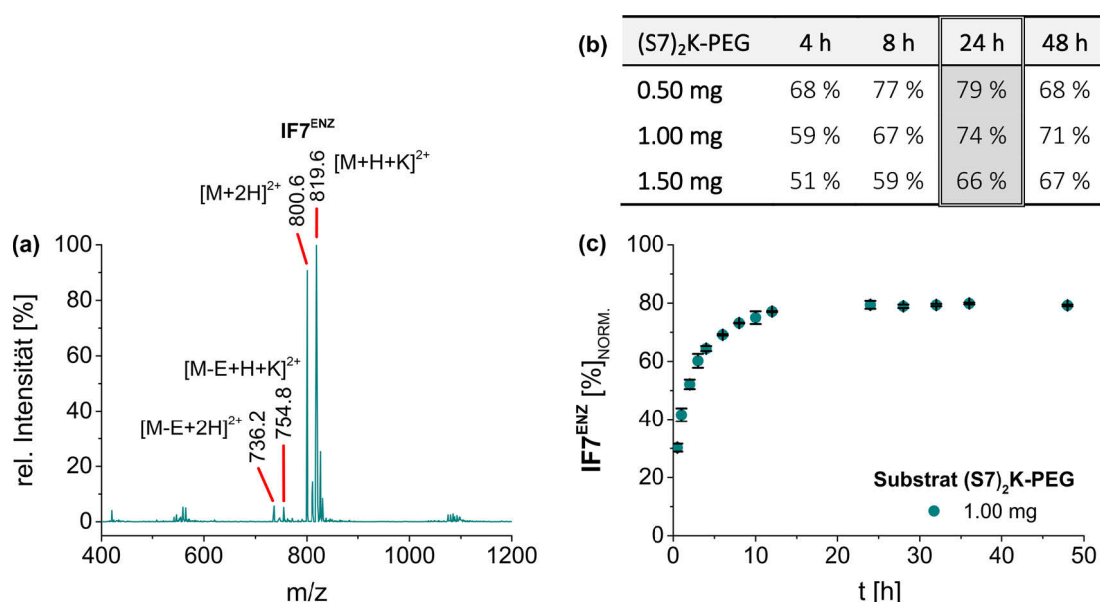


Abbildung 3.20. Qualitative und quantitative Analyse der enzymatischen Aktivierung des verzweigten Dimeres (S7)₂K-PEG unter Bildung des Binders (G-TBP)₂K-PEG^{ENZ} sowie der Suppressionsdomäne Ac-(EG)₄-ENLYFQ (IF7^{ENZ}): Das ESI-MS-Spektrum der chromatographisch isolierten Suppressionsdomäne IF7^{ENZ} zeigt die Massensignale der zweifach geladenen Addukt-Ionen [M+2H]²⁺ und [M+H+K]²⁺ bei m/z 800.6 bzw. 819.6 sowie das Aktivierungsprodukt der ersten Abbruchsequenz des Substrates (S7)₂K-PEG als Nebenprodukt mit den Addukt-Ionen [M-E+2H]²⁺ und [M-E+H+K]²⁺ bei m/z 736.2 bzw. 754.8 (a). Mittels analytischer RP-HPLC bestimmte Effizienz der enzymatischen Prozessierung von (S7)₂K-PEG in Abhängigkeit von Substratkonzentration und Proteolysezeitraum (b) sowie der zeitliche Verlauf der Aktivierung von 1.00 mg (S7)₂K-PEG (c). Gradient RP-HPLC: 0.0 – 2.0 min: 17.5 %, 2.0 – 15.0 min: 17.5 – 80 % Acetonitril in H₂O (0.1 % HCOOH, v/v/v), 210 nm. Bedingungen Proteolyse: 0.50 – 1.50 mg (S7)₂K-PEG, 56 Units TEV Protease, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 30 °C. Inhibierung: 10 mM Iodacetamid mit 0.2 % HCOOH (v/v).

Die Evaluierung der katalytischen Aktivität der Cysteinprotease gegenüber dem divalenten Biokonjugat wurde für verschiedenen Substratmengen von (S7)₂K-PEG zwischen 0.50 mg und 1.50 mg unter Verwendung von 56 Units TEV Protease durchgeführt. Um die Produktbildung

der proteolytisch abgetrennten Suppressionsdomäne **IF7^{ENZ}** zu einem definierten Zeitpunkt zu ermitteln, wurde die katalytische Aktivität des Enzyms durch eine wässrige 10 mM Iodacetamid-Lösung inhibiert.^[168, 277] In **Abbildung 3.20b** sind die einfach bestimmten Umsatzraten nach 4, 8, 24 und 48 Stunden unter Berücksichtigung der Reinheit des Substrates **(S7)₂K-PEG** aufgeführt (vgl. **Kapitel 5.6.2** Seite 142). Für 0.50 mg und 1.00 mg **(S7)₂K-PEG** ergab sich ein Substratumsatz von 79 % bzw. 74 % nach 24 Stunden Aktivierung. Dieses Resultat demonstrierte die hohe katalytische Effizienz der viralen Cysteinprotease zur Prozessierung divalenter Strukturen im Vergleich zu anderen proteolytischen Enzymen. So zeigten beispielsweise verzweigte Peptidtherapeutika eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Abbau durch die Serinproteasen aus dem Blutserum im Vergleich zu den entsprechend linearen Analoga.^[323, 324] Die geringere Umsatzrate von 71 % bei 48 Stunden durch die Aktivierung von 1.00 mg **(S7)₂K-PEG** wurde auf die 3 %ige Messunsicherheit des Gerätes zurückgeführt. Für den abweichenden Wert von 68 % bei 48 Stunden der Proteolyse von 0.50 mg des divalenten Substrates wurde ein Pipettierfehler bei der Probenentnahme vermutet und dieser deshalb nicht in die Betrachtungen miteinbezogen. Im Vergleich zu den erzielten Umsatzraten der beiden Messreihen nach 24 Stunden führte die Prozessierung von 1.50 mg **(S7)₂K-PEG** zu einer geringeren Ausbeute von 66 %. Folglich wurde die enzymatische Aktivierung von 1.00 mg des verzweigten Biokonjugates als optimales Ergebnis hinsichtlich einer effizienten Umsetzung hoher Substratkonzentrationen unter Aufwendung einer minimalen Enzymmenge von 56 Units TEV Protease betrachtet.

Daraus hervorgehend wurde die enzymatische Aktivierung von 1.00 mg **(S7)₂K-PEG** an Hand der Entstehung der proteolytisch abgetrennten Suppressionsdomäne **IF7^{ENZ}** über 48 Stunden verfolgt (vgl. **Abbildung 3.20c**).^[267] Bedingt durch den hohen Substratüberschuss ergab sich in der Anfangsphase ein schneller Verbrauch des verzweigten Biokonjugates mit einer Umsatzrate von 64 % innerhalb der ersten 4 Stunden der Proteolysereaktion. Die abnehmende Produktbildungsrate in den nachfolgenden 8 Stunden veranschaulichte den charakteristischen Verlauf enzymatisch katalysierter Reaktionen durch den Übergang von der Phase *steady state* zu *equilibrium*, wobei im Gleichgewichtszustand ein Substratumsatz von 79 % nach 24 Stunden ermittelt werden konnte. Die erhaltenen Ergebnisse ermöglichten es, die Oberflächenhaftung des enzymatisch aktivierten Dimeres **(S7)₂K-PEG** mit Hilfe von QCM-D-Experimenten zu evaluieren und die adhäsiven Eigenschaften des entstandenen Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** mit denen der synthetischen Referenz **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** zu vergleichen.

3.1.11 ENZYMATISCH AKTIVIERTE ADSORPTION DES SCHWACH-BINDENDEN DIMERES

Ausgehend von der quantitativen Analyse der enzymatischen Aktivierung des schwachbindenden Dimeres **(S7)₂K-PEG** konnte das Adsorptionsverhalten auf Titandioxid-Oberflächen mittels QCM-D untersucht werden. Dementsprechend wurden 1.00 mg Substrat mit 56 Units TEV Protease für 16 Stunden bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert und durch analytische RP-HPLC-Messungen ein Substratumsatz von 79 % indirekt bestimmt. Die Aktivierungslösung wurde nach einer Verdünnung von 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf die Sensoroberfläche gegeben.^[267] In **Abbildung 3.21** sind die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des prozessierten Biokonjugates **(S7)₂K-PEG** auf Titandioxid-Oberflächen den

Frequenzverschiebungen des nicht-aktivierten Vorläufers gegenübergestellt. Weiterhin sind die Referenzmessungen des synthetischen Analogons der Suppressionsdomäne IF7^{CHEM} und der zur Aktivierung verwendeten Enzymkonzentration an TEV Protease [56 Units] abgebildet. Für das aktivierte Dimer-Substrat $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ konnte ein rascher Frequenzabfall auf -38 Hz innerhalb der ersten 3 Minuten verzeichnet werden. Dies entsprach einer Beschichtung von 97 % gemessen an der Frequenzänderung von -39 Hz nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten.^[267] Folglich konnten durch die proteolytische Abtrennung der anionischen Suppressionsdomänen die adhäsiven Eigenschaften des divalenten Binders $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{ENZ}}$ effektiv zurückgebildet werden. Entsprechend des für das enzymresponsive Biokonjugat $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ ermittelten Substratumsatzes wurde für die abgespaltene Suppressionsdomäne IF7^{ENZ} eine Referenzlösung des synthetischen Analogons IF7^{CHEM} in Protease-Puffer angesetzt und diese verdünnt in Phosphat-Puffer vermessen. Erwartungsgemäß adsorbierte die haftungsunterbindende Einheit nur minimal und konnte im anschließenden Spülschritt wieder vollständig von der Oberfläche gelöst werden. Für die Referenzexperimente des nicht-aktivierten Dimeres $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ und der TEV Protease [56 Units] wurden Lösungen basierend auf den zur enzymatischen Aktivierung eingesetzten Konzentrationen verdünnt in Phosphat-Puffer aufgegeben.^[267] Das unbehandelte Biokonjugat zeigte eine leichte Oberflächenhaftung mit einer Frequenzänderung von -10 Hz während der Inkubationsphase. Im Gegensatz zu der Bindungskinetik des prozessierten $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ wies das nicht-aktivierte Substrat jedoch eine deutlich verlangsamte initiale Haftung auf. Dahingegen wurde der enzymatisch gebildete Dimer-Binder $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{ENZ}}$ zügig auf der Metalloxid-Oberfläche akkumuliert. Gemäß der Frequenzverschiebung des unbehandelten $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ nach 90 Minuten Inkubation konnte durch den Aktivierungsprozess die Materialanreicherung um 75 % gesteigert werden.

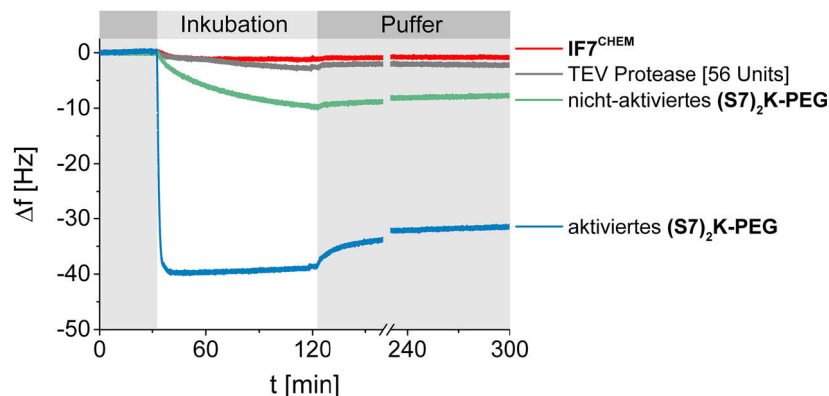


Abbildung 3.21. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des enzymatisch aktivierten $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ im Vergleich zu den Frequenzverschiebungen des nicht-aktivierten Vorläufers und des chemischen Analogons der Suppressionsdomäne IF7^{CHEM} sowie der TEV Protease [56 Units]. Für die Aktivierung wurden 1.00 mg $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ für 16 Stunden mit 56 Units TEV Protease in Gegenwart des Protease-Puffers bei einer Temperatur von 30°C inkubiert und die Lösung nach einer Verdünnung von 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgetragen. Das nicht-aktivierte $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ und des chemischen Analogon der Suppressionsdomäne IF7^{CHEM} sowie die Enzymreferenz wurden ebenfalls mit Protease-Puffer behandelt und nach einer Verdünnung von 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) vermessen. Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Aktivierungs- bzw. Referenzlösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Für die Enzymreferenz von 56 Units TEV Protease konnte während der Inkubationsphase eine Frequenzänderung von -3 Hz verzeichnet werden. Die verminderte Oberflächenhaftung – verglichen mit der zuvor durchgeführten Referenzmessung des aktivierten Unimeres **S4-PEG** unter Verwendung einer geringeren Konzentration von 28 Units Enzym (vgl. **Kapitel 3.1.3.1** Seite 42) – konnte durch die Verwendung der neuen Enzymcharge erklärt werden.^[267] Auch wenn eine saubere Präparation eines rekombinant exprimierten Enzyms ohne nachweisbare Mengen anderer, kontaminierender Proteine vorliegt, enthält diese sowohl aktives als auch inaktives Protein.^[325] Folglich kann der Anteil an aktiver Enzymspezies einer Charge gemessen an der Gesamtproteinmenge variieren. Deshalb wird die spezifische Aktivität für jede Enzympräparation neu ermittelt und ist somit nur auf den Anteil an katalytisch aktivem Protein geeicht.^[278] Die proteolytische wirksame Konzentration der für Prozessierung des Dimer-Substrates **(S7)₂K-PEG** verwendeten Enzymcharge wurde durch den Hersteller *Roboklon* auf $10 \text{ Units} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ bestimmt. Diese war damit zweifach so hoch konzentriert wie die zuvor eingesetzte Präparation mit $5 \text{ Units} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Folglich beinhaltet erstere einen deutlich geringeren Anteil an inaktivem Protein. Dadurch konnte die unspezifische Oberflächenhaftung der viralen Cysteinprotease entscheidend reduziert werden, obwohl eine höhere Enzymkonzentration für die Substratumsetzung eingesetzt wurde. Dies konnte an Hand von Kreuzexperimenten unter Verwendung der jeweils anderen Enzymcharge belegt werden (vgl. **Kapitel 5.7.10** Seite 162). Die Adsorptionsmessungen wurden unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität und den entsprechenden Aktivierungskonzentrationen durchgeführt.

Darüber hinaus konnte die Effektivität der enzymatisch erzeugten Beschichtung dem Adsorptionsverhalten des reinen Biokonjugates **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** sowie einer artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] gegenüber gestellt werden (vgl. **Abbildung 3.22**). Dabei bewirkte die Inkubation des synthetischen Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** eine leicht erhöhte Frequenzverschiebung von -44 Hz innerhalb von 90 Minuten verglichen mit der des enzymatisch aktivierten Biokonjugates **(S7)₂K-PEG** von -39 Hz.

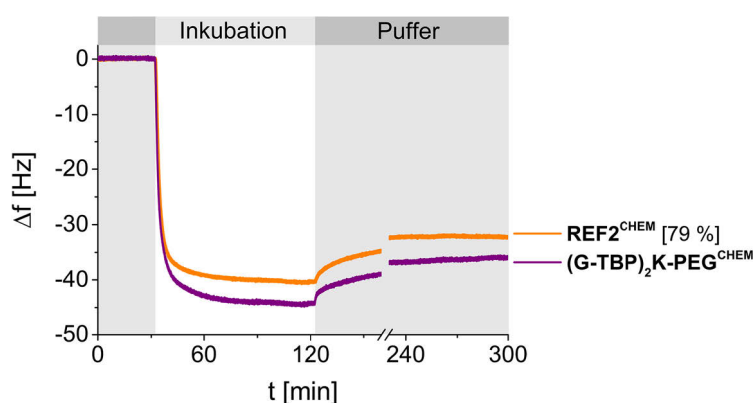


Abbildung 3.22. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des synthetischen Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** und der artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] entsprechend des ermittelten Substratumsatzes von 79 % bestehend aus den synthetischen Analoga **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** und **IF7^{CHEM}** sowie dem verbleibenden Edukt **(S7)₂K-PEG**. Der Binder **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** und die artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] wurden mit Protease-Puffer behandelt und nach einer Verdünnung von 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) vermessen. Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Referenzlösung inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Die Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] setzte sich aus den synthetischen Analoga des adhäsiven Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** und der Suppressionsdomäne **IF7^{CHEM}** sowie dem verbleibenden Substrat **(S7)₂K-PEG** zusammen. Im Vergleich zu **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** erzielte **REF2^{CHEM}** [79 %] eine nahezu identische Massenlagerung wie das aktivierte **(S7)₂K-PEG** gemessen an der Frequenzänderung von -40 Hz während der Inkubationsphase. Hinsichtlich der Bindungskinetiken der synthetischen Referenzen konnten im Vergleich zum aktivierten Dimer-Substrat **(S7)₂K-PEG** leichte Unterschiede verzeichnet werden. Entsprechend der Frequenzverschiebungen nach 3 Minuten Inkubation konnten **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** und **REF2^{CHEM}** [79 %] zu etwa 73 % bzw. 82 % an der Oberfläche angereichert werden. Da beide Referenzlösungen kein Enzym enthielten, wurde für die enzymatisch erzeugte Beschichtung haftungsverstärkende Effekte durch die Coadsorption^[288] des Biokonjugates **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** und der TEV Protease vermutet. Auch wenn die Cysteinprotease eine vergleichsweise geringe Oberflächenaffinität aufwies, könnten dennoch geringe Mengen des katalytisch aktiven Proteins das Adsorptionsverhalten des divalenten Binders beeinflussen und in die Beschichtung eingelagert werden. Eine Analyse der viskoelastischen Eigenschaften der gebildeten Beschichtungen an Hand der Auftragung der Dissipationsänderungen gegenüber den Frequenzverschiebungen sollte zur Aufklärung des beschriebenen Aspektes beitragen. In **Abbildung 3.23** sind die entsprechenden Graphen für die Inkubationsphase der QCM-D-Messungen des enzymatisch aktivierten Substrates **(S7)₂K-PEG** und des synthetischen Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** sowie der artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] dargestellt.

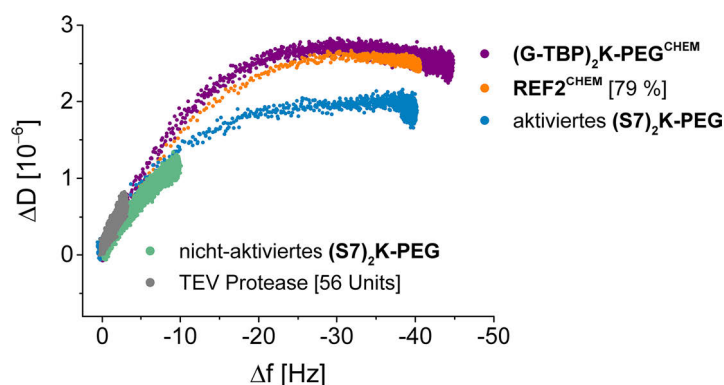


Abbildung 3.23. Auftragung der Dissipationsänderungen gegenüber den Frequenzverschiebungen zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der Beschichtungen des enzymatisch aktivierten **(S7)₂K-PEG** und des synthetischen Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** sowie der artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] im Vergleich zu den Verhältnissen $\Delta D/\Delta f$ des nicht-aktivierten **(S7)₂K-PEG** und der TEV Protease [56 Units].

Sowohl für die Beschichtungen von **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** als auch von **REF2^{CHEM}** [79 %] konnte ein hyperbolischer Zusammenhang zwischen den Dämpfungseigenschaften und der Massenadsorption festgestellt werden. Dabei bewirkte die initiale Haftung der Referenzen zunächst einen ähnlichen Anstieg der Dissipationen auf Werte um $2.8 \cdot 10^{-6}$ bzw. $2.6 \cdot 10^{-6}$, welche im Bereich der maximalen Frequenzänderungen geringfügig abnahmen. Die leicht verminderten Viskoelastizitäten der Beschichtungen mit zunehmenden Massenlagerungen könnten durch eine verringerte Beweglichkeit der gebundenen Biomakromoleküle auf der Sensoroberfläche zu erklären sein.^[289, 293, 294] Die Adsorption des enzymatisch aktivierten Substrates **(S7)₂K-PEG**

dagegen führte zu einem deutlich flacheren Anstieg des Verhältnisses $\Delta D/\Delta f$ und einer geringeren Dissipationsänderung im Bereich von $2.0 \cdot 10^{-6}$. Dies deutete darauf hin, dass verglichen mit den Beschichtungen der synthetischen Systeme **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** und **REF2^{CHEM}** [79 %] ein weniger viskoelastischer Film auf der Metalloxid-Oberfläche gebildet wurde.^[291, 292] Vermutlich veränderten die Coadsorption^[288] der höhermolekularen TEV Protease die Dämpfungseigenschaften der Beschichtung. Darüber hinaus konnte an Hand der Auftragung von ΔD gegenüber Δf keine Verdrängung des adsorbierten Peptid-PEG-Konjugates **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** durch das virale Enzym nachgewiesen werden. Sowohl für die Adsorption des nicht-aktivierten Dimers **(S7)₂K-PEG** als auch der TEV Protease [56 Units] ergab sich eine lineare Abhängigkeit des Verhältnisses von $\Delta D/\Delta f$ (vgl. **Abbildung 3.23**). Aufgrund der deutlich geringeren Dissipationsänderungen im Bereich von $1.3 \cdot 10^{-6}$ bzw. $0.7 \cdot 10^{-6}$ bewirkten die Massenanlagerungen der beiden Referenzen die Ausbildung rigiderer Filme.

Neben der Beschreibung des Adsorptionsverhaltens an Hand der Frequenzänderungen und der Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften der gebildeten Beschichtungen durch die Auftragung von ΔD gegenüber Δf konnten die Materialanreicherungen auf Titandioxid-Oberflächen quantitativ erfasst werden. Zur Bestimmung der adsorbierten Massen wurden die Beschichtungen des enzymatisch aktivierten Dimer-Substrates und der entsprechenden Aktivierungsreferenzen durch die physikalischen Modelle von SAUERBREY und VOIGT interpretiert.

3.1.12 ADSORBIERTE MASSEN NACH SAUERBREY und VOIGT

Die Schichtdicken und adsorbierten Massen nach VOIGT^[249-251] konnten für die viskoelastischen Beschichtungen des enzymatisch aktivierten Substrates **(S7)₂K-PEG** und des synthetischen Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** sowie der artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] ermittelt werden (vgl. **Tabelle 3.6**). Die mathematische Auswertung der Resonanzfrequenzen mittels der Modellierungssoftware QTools unter Berücksichtigung der Dissipationsobertöne durch das Anlegen einer Näherungsfunktion ergab für das aktivierte Dimer **(S7)₂K-PEG** eine Schichtdicke $d_{\text{VOIGT}} = 6.0 \pm 0.3 \text{ nm}$ und eine adsorbierte Masse $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 720 \pm 36 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$.^[267] Eine direkte Bestimmung der entsprechend adsorbierten Stoffmenge war nicht möglich, da in die berechneten Massenanlagerungen die Masse der in den Film eingebundenen Wassermoleküle miteinfließen.^[249] Dennoch ist eine Hochrechnung des Materialaufwandes zur Verdeutlichung des wirtschaftlichen Potentials der enzymatisch gebildeten Beschichtung näherungsweise möglich, der zufolge durch ein Gramm des aktivierten Systems eine Oberfläche von mindestens 140 m^2 Titandioxid beschichtet werden kann. Für die artifizielle Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] konnte eine ähnliche Massenadsorption wie für das enzymatisch aktivierte Substrat **(S7)₂K-PEG** verzeichnet werden, wobei die Schichtdicke des auf $d_{\text{VOIGT}} = 6.5 \pm 0.2 \text{ nm}$ und die adsorbierte Masse auf $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 780 \pm 24 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ bestimmt wurde. Im Vergleich dazu führte die Beschichtung des synthetischen Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** zu einer leicht erhöhten Materialanreicherung von etwa 15 % gemäß $d_{\text{VOIGT}} = 7.1 \pm 0.3 \text{ nm}$ bzw. $\Delta m_{\text{VOIGT}} = 852 \pm 36 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$. Aufgrund der ermittelten Schichtdicken der Systeme im Bereich von 6,0 – 7,1 nm wurde für die Beschichtungen die Ausbildung von Monolagen angenommen, wobei die Polymerketten in pilzartigen Konformationen auf der Metalloxid-Oberfläche angeordnet sind.^[296]

Die adsorbierten Massen nach SAUERBREY^[243] waren für die viskoelastischen Beschichtungen erwartungsgemäß unterbewertet^[249] und sind hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt. Dagegen konnten die rigiden Filme des nicht-aktivierten Biokonjugates **(S7)₂K-PEG** und der TEV Protease [56 Units] durch das Modell interpretiert werden (vgl. **Tabelle 3.6**). Bedingt durch den linearen Zusammenhang zwischen den aufgezeichneten Frequenz- und Dissipationsänderungen war der Anstieg des Verhältnisses $\Delta D_n / (-\Delta f_n / 3)$ für das unbehandelte Dimer **(S7)₂K-PEG** auf $1.3 \cdot 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$ und für die Enzymreferenz auf $2.5 \cdot 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$ bestimmt worden. Damit lagen die Werte unterhalb der Abgrenzung $\Delta D_n / (-\Delta f_n / n) \ll 4 \cdot 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$, welcher eine gute Näherung für die Gültigkeit des physikalischen Modells darstellt.^[298] Eine Berechnung der entsprechenden Schichtdicken und adsorbierten Massen nach VOIGT war für die Beschichtungen der beiden Aktivierungsreferenzen nicht möglich. Das Anlegen der Näherungsfunktion in QTools führte zu diskontinuierlich verlaufenden Funktionsgraphen hinsichtlich der zu approximierenden Parameter (vgl. **Kapitel 5.3.3.4** Seite 114). Für das schwach-bindende Dimer **(S7)₂K-PEG** konnte eine leichte Materialanreicherung nach SAUERBREY mit einer adsorbierten Masse $\Delta m_{\text{SAUERBREY}} = 147 \pm 20 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ ermittelt werden. Die Massenadsorption der TEV Protease mit $\Delta m_{\text{SAUERBREY}} = 38 \pm 5 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ konnte im Vergleich zu der für die enzymatisch erzeugte Beschichtung bestimmten Massenlagerung nach VOIGT vernachlässigt werden.^[267]

Tabelle 3.6. Adsorbierte Massen und Schichtdicken nach VOIGT^[249-251] unter Berücksichtigung der Dämpfungseigenschaften der viskoelastischen Beschichtungen des enzymatisch aktivierten **(S7)₂K-PEG** und des synthetischen Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** sowie der artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] ohne die Gegenwart der TEV Protease. Zusätzlich wurden für die Systeme die adsorbierten Massen nach dem SAUERBREY-Modell^[243] bestimmt, durch welches die rigiden Filme des nicht-aktivierten Vorläufers **(S7)₂K-PEG** und der TEV Protease [56 Units] ebenfalls interpretiert werden konnten.

QCM-D-Experiment	VOIGT:		SAUERBREY: $\Delta m [\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}]$				
	d [nm]	$\Delta m [\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}]$	\emptyset	n = 3	n = 5	n = 7	n = 9
aktiviertes (S7)₂K-PEG	6.0 ± 0.3	720 ± 36	626 ± 34	676	637	604	587
(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}	7.1 ± 0.3	852 ± 36	723 ± 36	776	731	704	679
REF2^{CHEM} [79 %]	6.5 ± 0.2	780 ± 24	652 ± 39	709	664	630	605
nicht-aktiviertes (S7)₂K-PEG	–	–	147 ± 20	174	149	136	129
TEV Protease [56 Units]	–	–	38 ± 5	44	39	38	30

Die Interpretation der Frequenz- und Dissipationsänderungen erfolgte durch die in der Software QTools hinterlegten physikalischen Modelle von SAUERBREY und VOIGT (vgl. **Kapitel 5.3.3.3** bzw. **Kapitel 5.3.3.4** Seite 114).

Die enzymatische Aktivierung des schwach-bindenden Dimer-Substrates **(S7)₂K-PEG** bewirkte die Bildung des divalenten Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}**, dessen Massenlagerung mit den Materialanreicherungen der artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] und des synthetischen Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** vergleichbar war. Durch die synthetische Dimer-Beschichtung von **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** war die unspezifische Adsorption der Serumproteins BSA auf Titandioxid-Oberflächen um bis zu 92 % verringert worden (vgl. **Kapitel 3.1.7** Seite 60). Demnach sollte geprüft werden, inwieweit die Antifouling-Eigenschaften des chemischen Analogons durch das enzymatisch aktivierte System reproduziert werden konnten.

3.1.13 ANTIFOULING-EIGENSCHAFTEN DER BESCHICHTUNG DES AKTIVIERTEN DIMERES

Zur finalen Untersuchung der Antifouling-Eigenschaften einer mit enzymatisch aktiviertem **(S7)₂K-PEG** beschichteten Titandioxid-Oberfläche wurde eine Lösung des Modellproteins BSA mit einer Konzentration von $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) verwendet. **Abbildung 3.24a** zeigt das Adsorptions- und Desorptionsverhalten von BSA gegenüber beschichtetem TiO_2 im Vergleich zu der Proteinadsorption auf einer unbeschichteten Oberfläche. Für die unbeschichtete Oberfläche war die starke Haftung des globulären Proteins an Hand der Frequenzverschiebung von -62 Hz während der Inkubationsphase nachvollzogen worden. Diese hatte zur Ausbildung einer irreversiblen Proteinschicht mit einer finalen Frequenzänderung von -51 Hz im nachfolgenden Spülschritt geführt.

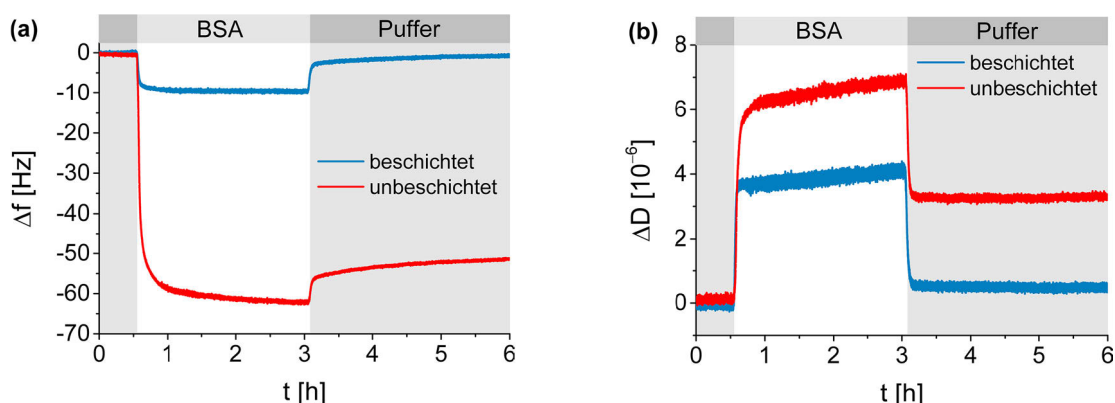


Abbildung 3.24. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf einer mit enzymatisch aktiviertem **(S7)₂K-PEG** beschichteten Titandioxid-Oberfläche im Vergleich zu einer unbeschichteten Oberfläche zur Untersuchung der Antifouling-Eigenschaften der Biokonjugat-Beschichtung: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: Sowohl die beschichtete als auch die unbeschichtete Oberfläche wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit einer BSA-Lösung mit einer Konzentration von $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Im Gegensatz dazu wurden die unspezifischen Wechselwirkungen von BSA mit der Metalloxid-Oberfläche durch die Beschichtung mit dem aus der enzymatischen Aktivierung von **(S7)₂K-PEG** hervorgegangenen Binder **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** signifikant vermindert. Entsprechend der beobachteten Frequenzverschiebung von -10 Hz im Bereich der Gleichgewichtseinstellung zwischen adsorbierenden und desorbierenden Proteinmolekülen wurden die Interaktionen um etwa 85 % reduziert.^[267] Im anschließenden Spülschritt mit Phosphat-Puffer konnte eine nahezu vollständige Reversibilität der Oberflächenhaftung von BSA verzeichnet werden, wobei sich die Resonanzfrequenz dem initial detektierten Wert annäherte. Folglich konnte die Beschichtung die Proteinadsorption auf TiO_2 um bis zu 99 % verringern. Gleichzeitig wurden die Antifouling-Eigenschaften im Vergleich zu der Beschichtung des synthetischen Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** um etwa 7 % verbessert. Somit führte die enzymatisch aktivierte Adsorption des schwach-bindenden Peptid-PEG-Konjugates **(S7)₂K-PEG** zu einer stabilen und proteinresistenten Beschichtung für Titandioxid-Oberflächen.

Die reduzierte Oberflächenhaftung des Modellproteins BSA konnte an Hand der verringerten Dissipationsänderungen von $6.9 \cdot 10^{-6}$ auf $4.1 \cdot 10^{-6}$ während der Inkubationsphase ebenfalls

veranschaulicht werden (vgl. **Abbildung 3.24b**). Demnach verminderte der enzymatisch gebildete Film von **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** die durch die Proteinadsorption hervorgerufenen viskoelastischen Eigenschaften des Systems im Vergleich zu der unbeschichteten Oberfläche. Der rasche Dissipationsabfall auf $3.3 \cdot 10^{-6}$ für unbehandeltes TiO₂ sowie auf $0.5 \cdot 10^{-6}$ für die beschichtete Oberfläche im anschließenden Spülschritt ließ auf eine strukturelle Umgestaltung der auf der Oberfläche angelagerten Moleküle schließen.^[313-315]

Durch die Integration divalenter Bindungsdomänen basierend auf der Adhäsionsdomäne **TBP** in ein enzymatisch aktivierbares Peptid-Polymer-Konjugat konnte eine signifikante Verbesserung der Antifouling-Eigenschaften erzielt werden. Ebenso bemerkenswert war die katalytische Effizienz der TEV Protease gegenüber der verzweigten Biokonjugat-Struktur. Dies ermöglichte eine erfolgreiche Umsetzung des Konzeptes der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten zur Generierung einer effizienten Antifouling-Beschichtung.

3.1.14 TEILZUSAMMENFASSUNG

Die Oberflächenhaftung der PEGylierten Adhäsionsdomäne RKLDPAPGMHTW (**TBP**) auf Titandioxid-Oberflächen in Form des Biokonjugates **G-TBP-PEG^{CHEM}** konnte durch *N*-terminal eingeführte Suppressionsdomänen unterdrückt werden und führte zu einer Serie nicht-bindender Peptid-PEG-Konjugate. Die Rückbildung der adhäsiven Eigenschaften der Systeme wurde durch die Integration der spezifischen Erkennungssequenz der TEV Protease ENLYFQ↓G zwischen Bindungsdomäne und haftungsunterbindender Einheit ermöglicht. Der konzeptionelle Ansatz der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten wurde an Hand des nicht-bindenden **S4-PEG** evaluiert, dessen anionische Suppressionsdomäne Ac-(EG)₂-ENLYFQ (**IF4**) auf Glutaminsäure-Seitenketten basierte. Im Hinblick auf materialwissenschaftliche Anwendungen wurde ein Aktivierungsprotokoll erarbeitet und die Effizienz der proteaseinduzierten Aktivierung in Abhängigkeit von Substrat- und Enzymkonzentration ermittelt. Daraus hervorgehend wurde die Umsetzung von 1.00 mg des enzymresponsiven Biokonjugates **S4-PEG** unter Verwendung der minimalen Enzymkonzentration von 28 Units TEV Protease als ein optimales Verhältnis hinsichtlich einer wirtschaftlichen Prozessierung hoher Substratmengen bestimmt. Durch die proteolytische Abtrennung der Suppressionsdomäne konnten die adhäsiven Eigenschaften des monovalenten Biokonjugat-Binders **G-TBP-PEG^{ENZ}** erfolgreich regeneriert werden.^[267]

Das Einbeziehen der Adhäsionsdomäne **TBP** als zweifaches Bindungsmotiv in eine verzweigte Biokonjugat-Struktur **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** führte zu einer verstärkten Oberflächenhaftung auf Titandioxid-Oberflächen um 26 % im Vergleich zum unimeren Äquivalent. Die Bestimmung der scheinbaren Affinitätskonstante $K_A = 1.60 \pm 0.75 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ mithilfe des LANGMUIR'schen Adsorptionsmodells charakterisierte das divalente Peptid-PEG-Konjugat als starken Binder für die Metalloxid-Oberfläche. Durch die Erweiterung der Suppressionsdomäne des nicht-bindenden **S4-PEG** um zwei EG-Einheiten zu Ac-(EG)₄-ENLYFQ (**IF7**) konnten die adhäsiven Eigenschaften des verzweigten Dimer-Binders entscheidend reduziert werden. Die enzymatische Aktivierung des schwach-bindenden Substrates **(S7)₂K-PEG** mittels 56 Units TEV Protease führte zu einer stabilen Biokonjugat-Beschichtung **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}**, durch welche die

unspezifischen Wechselwirkungen des Modellproteins BSA mit der Metalloxid-Oberfläche vollständig unterbunden werden konnten.^[267] Die Resultate gewährten Einblicke in die gezielte Manipulation der Oberflächenhaftung einer peptidbasierten Adhäsionsdomäne durch synthetische Modifikationen sowie in die Ausbildung proteinresistenter Biokonjugat-Beschichtungen auf der Grundlage eines enzymatischen Aktivierungsprozesses.

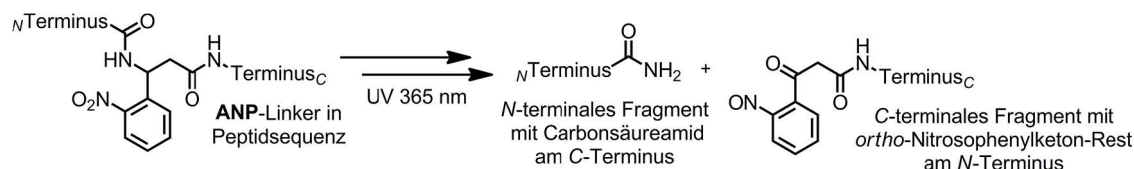
3.2 Lichtaktivierbare Photoschalter als Alternative zur enzymatisch induzierten Adsorption von Peptid-Polymer-Konjugaten

Die Aktivierung einer gewünschten Funktion kann nicht nur enzymatisch induziert werden. Vielmehr sind zahlreiche weitere Wirkmechanismen verfügbar, um die strukturellen und funktionalen Eigenschaften von Biokonjugaten zu programmieren. Eine Klassifizierung der materialwissenschaftlich relevanten Stimuli wurde bereits in **Kapitel 2.3** (vgl. Seite 8) vorgenommen.^[5] Insbesondere die Bedeutung äußerer physikalischer Stimuli wie die Variation der Temperatur oder die Einwirkung von Licht ist hervorzuheben. Im Vergleich zu chemisch oder biologisch induzierten Schaltmechanismen ist deren Effektivität weder von der sterischen Zugänglichkeit der zu regulierenden Komponente noch der kinetisch limitierten Diffusion abhängig.^[125] Somit bewirken äußere Einflüsse in Regel eine schnellere Aktivierung als ein zusätzlich in das System eingebrachter Stimulus.^[33] Insbesondere die Responsivität gegenüber elektromagnetischer Strahlung ermöglicht einen selektiven und orthogonalen Schaltprozess.

Die kinetischen Untersuchungen hinsichtlich einer effizienten Prozessierung enzymatisch aktivierbarer Peptid-PEG-konjugate hatten ergeben, dass die proteolytische Abtrennung der eingeführten Suppressionsdomänen relativ langsam verläuft (vgl. **Kapitel 3.1.2.4** Seite 39 bzw. **Kapitel 3.1.10** Seite 65).^[267] Im Hinblick auf eine potentielle Anwendung der Systeme als *in situ* Beschichtungen für Titandioxid-Oberflächen ist jedoch ein schneller und quantitativer Aktivierungsprozess zur Freisetzung der peptidbasierten Binder zu bevorzugen. Daher entstand die Überlegung, die spezifische Erkennungssequenz der TEV Protease ENLYFQ↓G durch einen geeigneten lichtaktivierbaren Photoschalter zu ersetzen. Das Einbeziehen photolabiler Gruppen zwischen den haftungsunterbindenden Einheiten und der Adhäsionsdomäne **TBP** würde eine zügige Abspaltung der Suppressionsdomänen ermöglichen und gleichzeitig zur Rückbildung der adhäsiven Biokonjugat-Strukturen führen. Neben einer Verminderung der Aktivierungszeit könnten durch den Austausch sowohl der synthetischen Aufwand als auch der Materialbedarf reduziert werden. Der konzeptionelle Ansatz zur Integration lichtaktivierbarer Photoschalter als Alternative zur enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Biokonjugaten wurde von DORIAN MIKOLAJCZAK im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit *Photochemische Aktivierung peptidbasierter Adhäsionsdomänen* (2014) umgesetzt.^[326] Das Projekt wurde parallel zum enzymbasierten Aktivierungsprinzip erarbeitet, um das materialwissenschaftliche Potential der photochemisch induzierten Oberflächenhaftung von Biokonjugaten evaluieren zu können.

Aufgrund der Vorteile lichtinduzierter Aktivierungsprozesse wurde eine Reihe sowohl reversibel schaltbarer als auch irreversibel spaltbarer Moleküle für chemische und biomedizinische Anwendungen entwickelt.^[327, 328] Anfänglich als photolabile Schutzgruppen für die organischen Synthese entworfen, ermöglichen lichtaktivierbare Photoschalter unter anderem eine orthogonale Abspaltung geschützter Peptide unter milden Bedingungen vom festen Trägermaterial nach der festphasengebundenen Synthese.^[329] Darüber hinaus können photochemisch spaltbare Gruppen zur Maskierung bioaktiver Moleküle – sogenannte Caged-Verbindungen (z. dt. *Käfig*) – herangezogen werden.^[330, 331] Der temporäre Funktionsverlust erlaubt den Transport und die Anreicherung der inaktiven Spezies sowie die kontrollierte Freisetzung am Wirkort. Am häufigsten Anwendung finden lichtaktivierbare Photoschalter auf Basis der *ortho*-Nitrobenzyl-

Gruppe (ONB).^[332-334] Eine kommerziell verfügbare Variante ist der 3-Amino-3-(*ortho*-nitrophenyl)propionsäure-Linker (ANP), welcher synthetisch einfach zugänglich ist und als Fmoc-geschütztes Aminosäure-Derivat direkt in die festphasengebundene Peptidsynthese miteinbezogen werden kann.^[335] Die lichtinduzierte Aktivierung ONB-modifizierter Peptidstrukturen führt zur Abspaltung des *N*-terminalen Sequenzabschnittes mit einem Carbonsäureamid am C-Terminus, während ein *ortho*-Nitrosophenylketon-Rest am *N*-Terminus der Peptiddomäne verbleibt (vgl. **Schema 3.1**).



Schema 3.1. Die Bestrahlung des Photoschalters 3-Amino-3-(*ortho*-nitrophenyl)propionsäure (ANP) integriert in eine Peptidsequenz führt zur Abspaltung des *N*-terminalen Sequenzabschnittes mit einem Carbonsäureamid am C-Terminus, während ein *ortho*-Nitrosophenylketon-Rest am *N*-Terminus der Peptiddomäne verbleibt.^[335]

Auf Grundlage der im Rahmen der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-Polymer-Konjugaten evaluierten Suppressionsdomänen zur Unterdrückung der Oberflächenhaftung der PEGylierten Adhäsionsdomäne **TBP** wurde das potentiell nicht-bindende Photolysesubstrat **S4^{ANP}-PEG** synthetisiert.^[326] Als haftungsunterbindende Einheit diente die negativ geladene Glutaminsäure in Form vom Ac-(EG)₂FG (**IF4^{UV}**), wobei das zusätzlich eingeführte Phenylalanin zur Steigerung der UV-Sensitivität für eine spätere Quantifizierung an Hand der photodissoziierten Domäne integriert wurde. Gleichzeitig wurde die zur enzymatischen Abtrennung notwendige Erkennungssequenz der TEV Protease durch den ANP-Photoschalter ersetzt. Um den Einfluss des nach der photochemischen Aktivierung am Biokonjugat verbleibendem *ortho*-Nitrosophenylketon-Restes auf die Oberflächenhaftung der Adhäsionsdomäne **TBP** abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein synthetisches Analogon des photolytisch gebildeten Binders **ANP^G-TBP-PEG^{CHEM}** hergestellt. In **Tabelle 3.7** sind die Nettoladungen bei pH 7.0 und isoelektrischen Punkte der beiden Strukturen den entsprechenden Werten der jeweiligen Biokonjugat-Analoga der enzymatisch aktivierbaren Adsorption **G-TBP-PEG^{CHEM}** und **S4-PEG** unter Angabe der eingeführten Suppressionsdomänen gegenübergestellt.

Tabelle 3.7. Überblick zu den Nettoladungen bei pH 7.0 und IEPs des lichtaktivierbaren Substrates **S4^{ANP}-PEG** und des synthetischen Analogons der Photolysereaktion **ANP^G-TBP-PEG^{CHEM}** im Vergleich zu den entsprechenden Werten der strukturellen Biokonjugat-Analoga der enzymatisch aktivierbaren Adsorption **S4-PEG** und **G-TBP-PEG^{CHEM}** unter Angabe der jeweiligen Suppressionsdomänen.

Peptid-PEG-Konjugat	Suppressionsdomäne	Nettoladung ^a (pH 7.0)	IEP ^a
ANP^G-TBP-PEG^{CHEM}	–	+ 1.83	11.20
S4^{ANP}-PEG	Ac-(EG) ₂ FG	– 1.16	15.66
G-TBP-PEG^{CHEM}	–	+ 1.83	11.20
S4-PEG	Ac-(EG) ₂	– 1.85	15.02

^a Nettoladungen und IEPs wurden mittels der Software SEDNTERP berechnet.^[268]

Die QCM-D-Messungen des lichtaktivierbaren Substrates **S4^{ANP}-PEG** und des synthetischen Photolyseproduktes **^{ANP}G-TBP-PEG^{CHEM}** wurden in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0)^[326] durchgeführt und sind im Vergleich zu Adsorptions- und Desorptionsisothermen der Analoga des enzymbasierten Aktivierungskonzeptes **S4-PEG** bzw. **G-TBP-PEG^{CHEM}** in **Abbildung 3.25** dargestellt. Der synthetische Binder **^{ANP}G-TBP-PEG^{CHEM}** zeigte nach der Äquilibrierungsphase einen schnellen Frequenzabfall auf – 14 Hz innerhalb der ersten 3 Minuten, wobei im Gleichgewichtszustand zwischen Adsorption und Desorption eine Frequenzverschiebung von bis zu – 24 Hz nach einer Inkubationszeit von 3.5 Stunden verzeichnet wurde.^[326] Dies entsprach einer Massenanlagerung von 69 % im Vergleich zu der durch **G-TBP-PEG^{CHEM}** erzielten Materialanreicherung gemessen an der während der Inkubationsphase beobachteten Frequenzänderung von – 35 Hz. Darüber hinaus ergab sich für die Beschichtung von **^{ANP}G-TBP-PEG^{CHEM}** eine Reversibilität von etwa 29 %. Folglich war der Massenverlust gegenüber dem des synthetischen Analogons der enzymatisch aktivierbaren Adsorption **G-TBP-PEG^{CHEM}** mit 20 % leicht erhöht.

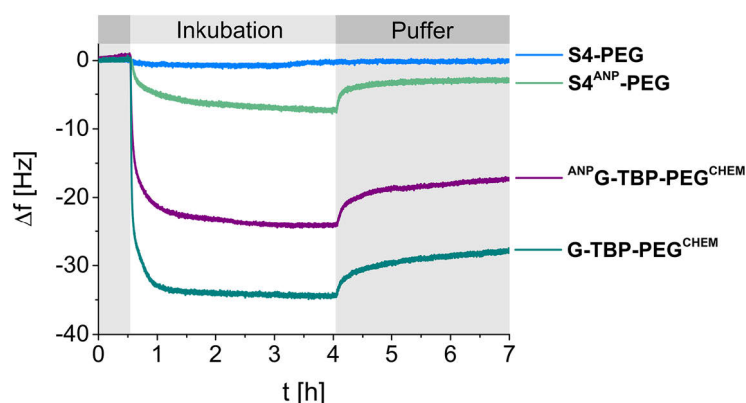


Abbildung 3.25. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des lichtaktivierbaren Substrates **S4^{ANP}-PEG** und des synthetischen Analogons der Photolysereaktion **^{ANP}G-TBP-PEG^{CHEM}** im Vergleich zu den Frequenzverschiebungen der Biokonjugat-Analoga der enzymatisch aktivierbaren Adsorption **S4-PEG** und **G-TBP-PEG^{CHEM}**. Bedingungen: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, danach mit der jeweiligen Biokonjugat-Lösung mit einer Konzentration von 11.2 μM inkubiert und anschließend mit Puffer gespült.

Für das lichtaktivierbare Substrat **S4^{ANP}-PEG** konnte während der Inkubationsphase eine Frequenzänderung von – 7 Hz verzeichnet werden.^[326] Zwar zeigte sich im anschließenden Spülschritt eine Reversibilität des adsorbierten Materials von etwa 57 %, jedoch wurde der gebildete Film dabei nicht vollständig von der Metalloxid-Oberfläche abgetragen und resultierte in einer finalen Frequenzverschiebung von – 3 Hz. Dementsprechend wurde die Massen-anlagerung des synthetischen Photolyse-Binders **^{ANP}G-TBP-PEG^{CHEM}** durch die anionische Suppressionsdomäne Ac-(EG)₂FG um etwa 71 % reduziert. Dieses Resultat entsprach den Erwartungen, da durch die eingeführten Glutaminsäure-Seitenketten die Nettoladung des Systems lediglich auf – 1 eingestellt werden konnte (vgl. **Tabelle 3.7**). Dahingegen führte die enzymatisch abtrennbare Suppressionsdomäne Ac-(EG)₂ENLYFQ (**IF4^{ENZ}**) des Proteolyse-Substrates **S4-PEG** zu einer Nettoladung von – 2 und ermöglichte aufgrund des Zusammenwirkens von anionischen und hydrophoben Aminosäuren eine vollständige Entfernung des adsorbierten Materials durch das Spülen mit Phosphat-Puffer. Verglichen mit **IF4^{ENZ}** beinhaltete die haftungsunterbindende Einheit Ac-(EG)₂FG einen höheren Anteil an polaren Aminosäuren,

welche verstärkt Wechselwirkungen mit hydrophilen anorganischen Oberflächen eingehen können.^[336, 337] Die Resultate veranschaulichten erneut die Komplexität peptidinduzierter Adsorptionsprozesse bzw. der Unterdrückung dieser durch synthetische Modifikationen. Folglich sind geeignete Suppressionsdomänen systemspezifisch auf die Adhäsionsdomäne bzw. deren chemische (Aminosäure-Seitenketten, Nettoladung *etc.*) und physikalische Merkmale (Sekundärstruktur, Stabilität *etc.*) unter Berücksichtigung der Eigenschaften der stimuliresponsiven Einheit abzustimmen. Dennoch waren die Adsorptionsmessungen im Hinblick auf den konzeptionellen Ansatz der Integration lichtaktivierbarer Photoschalter als Alternative zur enzymatisch aktivierbaren Adsorption sachdienlich. Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichten grundlegende Untersuchungen hinsichtlich der photolytisch induzierten Oberflächenhaftung.

Hervorgehend aus den Haftungsexperimenten der synthetischen Referenz $\text{ANP}\mathbf{G}\text{-TBP-PEG}^{\text{CHEM}}$ und des lichtaktivierbaren Substrates $\mathbf{S4}^{\text{ANP}}\text{-PEG}$ konnte dessen Adsorptionsverhalten nach der photochemischen Aktivierung auf Titandioxid-Oberflächen analysiert werden. Dafür wurde $\mathbf{S4}^{\text{ANP}}\text{-PEG}$ mit einer Konzentration von 8 mM in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und für 4 Stunden mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt.^[326] Nach 30 Minuten und 1 Stunde wurden der Aktivierungslösung Proben entnommen und diese nach einer Verdünnung von 1:700 (v/v) in Phosphat-Puffer auf die Sensoroberflächen aufgetragen. (vgl. **Abbildung 3.26a**). Dabei konnten lediglich Frequenzänderungen von – 12 Hz bzw. – 14 Hz verzeichnet werden. Verglichen mit der Materialanreicherung des nicht-aktivierten Photolyse-Substrates $\mathbf{S4}^{\text{ANP}}\text{-PEG}$ war die Massenanlagerung auf der Metalloxid-Oberfläche nach der lichtinduzierten Aktivierung nur unwesentlich erhöht. Weiterhin zeigten die Biokonjugat-Beschichtungen einen deutlich ausgeprägteren Massenverlust von bis zu 50 % während des anschließenden Spülschrittes. Erst nach einer Bestrahlung von $\mathbf{S4}^{\text{ANP}}\text{-PEG}$ über einen Zeitraum von 4 Stunden konnte eine signifikant höhere Materialanreicherung mit einer Frequenzänderung im Bereich von – 23 Hz erzielt werden (vgl. **Abbildung 3.26a**). Im Vergleich zu der Adsorptionsisotherme des synthetischen Binders $\text{ANP}\mathbf{G}\text{-TBP-PEG}^{\text{CHEM}}$ wurden nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich der initialen Oberflächenhaftung verzeichnet. Die Resultate zeigten erste Ansätze für eine erfolgreiche Umsetzung der photochemisch aktivierten Adsorption von Peptid-PEG-Konjugaten als Alternative zu enzymbasierten Aktivierungsprozessen.

Die Entstehung der gewünschten Photolyseprodukte konnte an Hand massenspektrometrischer Analysemethoden verifiziert werden (vgl. **Abbildung 3.26b**). Das MALDI-ToF-MS-Spektrum der photochemischen Aktivierung von $\mathbf{S4}^{\text{ANP}}\text{-PEG}$ nach vierstündiger Bestrahlung zeigt die Bildung der photodissoziierten Suppressionsdomäne $\mathbf{IF4}^{\text{UV}}$ als die zwei Addukt-Ionen $[\text{M}+\text{Na}]^+$ und $[\text{M}+\text{K}]^+$ bei m/z 657.8 (*ber.* m/z 658.6) bzw. m/z 673.8 (*ber.* m/z 674.7). Das Massensignal bei m/z 567.5 (*ber.* m/z 565.6) entsprach dem Matrixcluster-Addukt-Ion $[\text{M}_3+\text{H}]^+$ der zur Ionisierung verwendeten MALDI-Matrix α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (αCHCA).^[338] Die Entstehung der adhäsiven Biokonjugat-Struktur $\text{ANP}\mathbf{G}\text{-TBP-PEG}^{\text{UV}}$ konnte ebenfalls qualitativ nachgewiesen werden. Die Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten von Poly(ethylenglycol) führten zu der charakteristischen Molmassenverteilung einer PEGylierten Peptidsequenz mit Massensignalen in Intervallen von $\Delta M = 44$ m/z . Die maximale Signalintensität bei m/z 4901.8 mit einer Abweichung von unter 0.1 %^[276] im Vergleich zum theoretischen Wert *ber.* m/z 4899.7 konnte dabei

dem Addukt-Ion $[M+H]^+$ ($n = 74$) des Biokonjugates zugeordnet werden. Weiterhin konnte eine zweite Molmassenverteilung detektiert und an Hand des Massensignals bei m/z 4884.6 als ein Addukt-Ion $[M+H-H_2O]^+$ ($n = 74$) des photochemisch gebildeten Binders nach Abspaltung eines ungeladenen Wassermoleküls identifiziert werden. Der Dehydratisierungsvorgang kann unter anderem chemisch induziert worden sein^[339] oder während der massenspektrometrischen Analyse durch die Ionisierung der Moleküle in die Gasphase auftreten.^[340]

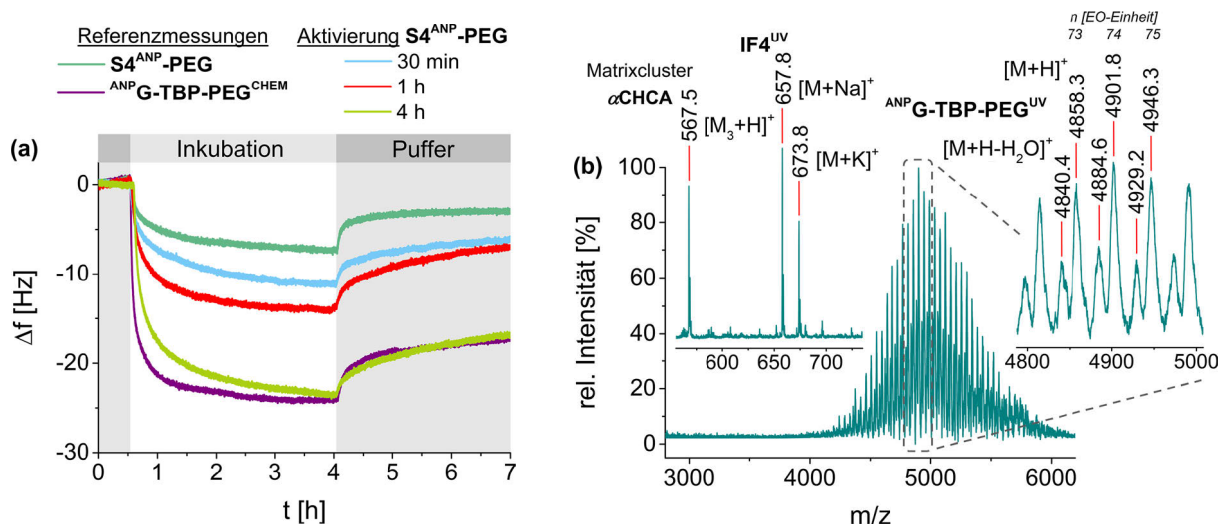


Abbildung 3.26. Qualitative Analyse der photochemischen Aktivierung von **S4^{ANP}-PEG** unter Bildung des adhäsiven Biokonjugates **ANP-G-TBP-PEG^{UV}** sowie der abgespaltenen Suppressionsdomäne Ac-(EG)₂FG (**IF4^{UV}**): Adsorptions- und Desorptionsisothermen des aktivierten **S4^{ANP}-PEG** in Abhängigkeit von der Zeit im Vergleich zu den Frequenzverschiebungen des synthetischen Analogons des Photolyseproduktes **ANP-G-TBP-PEG^{CHEM}** und des nicht-aktivierten **S4^{ANP}-PEG** (a). Bedingungen Photolyse: 8.0 mM **S4^{ANP}-PEG**, 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0), 365 nm. Bedingungen QCM-D: Die titanbeschichteten Sensoren wurden mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) äquilibriert, mit der jeweiligen Aktivierungslösung 1:700 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) bzw. der Biokonjugat-Lösung inkubiert und danach mit Puffer gespült. Das MALDI-ToF-MS-Spektrum nach 4 Stunden Bestrahlung zeigt die Addukt-Ionen $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ der Suppressionsdomäne **IF4^{UV}** bei m/z 657.8 bzw. m/z 673.8 sowie die Molmassenverteilung des Biokonjugates **ANP-G-TBP-PEG^{UV}** mit Signalen in Intervallen $\Delta M = 44$ m/z , wobei die maximale Signalintensität bei m/z 4901.8 dem Addukt-Ion $[M+H]^+$ ($n = 74$) entspricht (b).

Darüber hinaus konnte in den durchgeführten MALDI-Studien nach einer Bestrahlungszeit von 4 Stunden das photoresponsive Edukt **S4^{ANP}-PEG** nicht mehr nachgewiesen werden. Unerwünschte Nebenreaktionen während einer langandauernden Einwirkung von UV-Licht auf peptidbasierte Verbindungen wie die photochemische Oxidation der Aminosäure-Seitenkette von Methionin^[341] wurden für das lichtaktivierte Substrat **S4^{ANP}-PEG** bzw. den entstandenen Binder **ANP-G-TBP-PEG^{UV}** nicht beobachtet. Die erzielten Ergebnisse hinsichtlich der photochemisch induzierten Oberflächenhaftung hervorgehend aus dem nicht-aktivierten Vorläufer **S4^{ANP}-PEG** sowie der qualitative Nachweis des adhäsiven Biokonjugates **ANP-G-TBP-PEG^{UV}** belegten, dass der konzeptionelle Ansatz der enzymatisch aktivierbaren Adsorption durch die Integration lichtaktivierbarer Photoschalter erfolgreich weiterentwickelt werden konnte.

Durch die verkürzte Photolysedauer verglichen mit den Proteolysezeiten der Biotransformation zur Ausbildung monovalenter Biokonjugat-Binder konnte das Potential lichtbasierter Aktivierungen verdeutlicht werden. Dennoch ist die für die ONB-modifizierte Struktur **S4^{ANP}-PEG**

notwenige Bestrahlung über 4 Stunden zur Rückbildung der adhäsiven Eigenschaften für einen photochemisch induzierten Schaltprozess nach wie vor relativ zeitaufwändig, da unsubstituierte ONB-Einheiten wie der **ANP**-Linker vornehmlich elektromagnetische Strahlung des fernen und mittleren UV-Bereiches absorbieren.^[342] Zielsetzung wäre es nun, photolabile Linker mit erhöhten Photosensitivitäten wie beispielsweise bromsubstituierte Coumarin-Chromophore^[343-345] in eine Biokonjugat-Struktur zu integrieren, um photoresponsive Systeme mit anwendungsrelevanten Antifouling-Eigenschaften zu erzeugen. Mit PEGylierten Bindern auf Basis der Adhäsionsdomäne **TBP** wurden bisher nur durch verzweigte Architekturen proteinresistente Beschichtungen für Titandioxid-Oberflächen erhalten. Die starke Oberflächenhaftung des Dimer-Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** hervorgehend aus der enzymatischen Aktivierung des schwach-bindenden Vorläufers **(S7)₂K-PEG** konnte jedoch auch durch verlängerte anionische Suppressionsdomänen Ac-(EG)₄ (**IF7**) nicht vollständig unterbunden werden. Somit setzt die Integration lichtaktivierbarer Photoschalter als stimuliresponsive Einheit eine systemspezifische Evaluierung geeigneter Suppressionsdomänen für adhäsive Dimer-Strukturen voraus. Vor dem Hintergrund der moderaten Reinheit des enzymatisch aktivierbaren Substrates **(S7)₂K-PEG** und der Intention, Biokonjugate zu hochreinen Produkten quantitativ umzusetzen zu können, sind perspektivisch umfangreiche Aufreinigungsschritte erforderlich. Eine gezielte Entwicklung flüssigchromatographischer Trennmethode zur Isolierung der PEGylierten Aktivierungssubstrate von den entsprechenden Fehlsequenzen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr realisiert werden.

3.3 Elastische Hydrogelpartikel als Biosensor-Systeme für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen

Auf der Grundlage elastischer Hydrogelpartikel als mechanisch verformbare Sonden (SCPs, engl. *soft colloidal probes*) können die adhäsiven Wechselwirkungen biomakromolekularer Strukturen gegenüber einer Vielzahl beschichteter und nicht-modifizierter Substratoberflächen charakterisiert werden.^[258, 259, 346] Beispielsweise verwendeten HARTMANN und SCHMIDT die SCP-Methode erst kürzlich zur Beschreibung der Oberflächenaffinität des dimeren Adhäsionsproteins Fibronectin gegenüber polymerbeschichteten Glasoberflächen.^[261] Die an Poly(acrylsäure)-basierte Hydrogelpartikel immobilisierten Proteinstrukturen bildeten charakteristische Oberflächenkontakte auf den hydrophoben Materialien, welche reflexionskontrastmikroskopisch (RICM, engl. *reflection interference contrast microscopy*) analysiert wurden. Die detektierten Kontaktprofile waren vergleichbar mit der Fibronectin-Anbindung an Zelloberflächen. In biologischen Systemen beruhen die adhäsiven Eigenschaften des extrazellulären Matrixproteins auf dem Rezeptorbindungsmotiv RGD und bewirken unter anderem die Verankerung von Zellen über die Transmembranproteinklasse der Integrine.^[144] Durch die RICM-Messungen konnte einen Einblick in die adhäsiven Eigenschaften von Fibronectin gewährt und die mechanische Flexibilität zellulärer Adhäsionsprozesse quantitativ erfasst werden.^[261]

Begründet durch das unbestreitbare Potential elastischer Hydrogelpartikel als Affinitätsbiosensor-Systeme wurde die quantitative Analyse enzymatisch aktivierbarer Adhäsionsdomänen unter Verwendung der SCP-Methode als eine weitere Zielstellung der vorliegenden Arbeit formuliert. Das interdisziplinäre Teilprojekt wurde in Kooperation mit den Abteilungen Kolloidale Bioadhäsion und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Prof. Dr. STEPHAN SCHMIDT und Prof. Dr. LAURA HARTMANN erarbeitet. Dabei wurde auf PEG-basierte Mikropartikel als Sondenmaterial zur Interpretation der enzyminduzierten Adsorption zurückgegriffen, deren postsynthetische Modifikation mit geeigneten funktionellen Gruppen die selektive Immobilisierung von Biomakromolekülen ermöglicht.

3.3.1 PEG-SCPs ZUR SELEKTIVEN IMMOBILISIERUNG BIOMAKROMOLEKULARER STRUKTUREN

Elastische PEG-Hydrogelpartikel können durch die lichtinduzierte Fällungspolymerisation langkettiger PEG-Diacrylamid-Makromoleküle hergestellt werden.^[257] Diese führt in Abhängigkeit der molekularen Massen der Makromonomere zu polydispersen Mikropartikeln mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden.^[347] Im Anschluss an die Synthese können die PEG-SCPs in Gegenwart des Photoinitiators Benzophenon radikalisch funktionalisiert werden.^[348] Die Bestrahlung durch UV-Licht (ca. 350 nm) bewirkt die Bildung freier Alkoxyradikale am Polymerrückgrat, welche die Einführung von Amino- oder Carboxylfunktionen über acrylbasierte Monomere zulassen (vgl. **Abbildung 3.27a**).^[257] Für die Modifikation des Sondenmaterials mit Carboxylgruppen werden beispielsweise die Monomere Acrylsäure oder Crotonsäure (CA, engl. *crotonic acid*) verwendet.^[257, 262] Hierbei ist es möglich, durch Anpassung der Konzentration an Benzophenon und der Bestrahlungszeit den Funktionalisierungsgrad (FD, engl. *functionalization degree*) nach Bedarf einzustellen.^[262] So können die biomakromole-

kularen Strukturen in einfachen Kupplungsreaktionen über deren primäre Amine an die elastischen Kolloide immobilisiert werden.^[266] Darüber hinaus erlauben in einem weiteren Schritt eingeführte Funktionalitäten die Anbindung der zu analysierenden Spezies über selektive Ligationsreaktionen. Unter anderem können Maleinimide durch geeignete Derivate wie beispielsweise 2-Maleinimid-Ethylamin mittels einfacher Kupplungsreagenzien eingeführt werden. Die resultierenden Affinitätsbiosensor-Systeme **[PEG]-Mal** sind durch die freien Thiol-Funktionen biologischer Verbindungen in einer MICHAEL-Additionsreaktion adressierbar und führen zu stabilen Thioetherbindungen (vgl. **Kapitel 2.2.2** Seite 6).^[80, 86]

Die Synthese und Modifikation elastischer PEG-SCPs mit Maleinimid-Funktionen sowie die Charakterisierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften von **[PEG]-Mal** wurden von HANQING WANG aus der Arbeitsgruppe HARTMANN vorgenommen. Ausgehend von linearen PEG-Diarylamid-Makromonomeren mit einer molekularen Masse von $8.0 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ wurden zunächst PEG-Mikropartikel mit einem Elastizitätsmodul von $32 \pm 5 \text{ kPa}$ erhalten.^[262, 347] Die Einführung von Carboxylgruppen durch CA-Monomere ermöglichte anschließend die Immobilisierung der Maleinimid-Funktionen. Durch die photometrische Rücktitration der nicht umgesetzten Carboxylgruppen mittels Toluidinblau O (TBO) konnte der Funktionalisierungsgrad an Maleinimiden der Hydrogelpartikel **[PEG]-Mal** indirekt bestimmt werden.^[349, 350] **Abbildung 3.27b** zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen entsprechend Maleinimid-modifizierter PEG-SCPs **[PEG]-Mal** mit einem FD $[\text{Mal}] = 36 \pm 5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, welche durch Umsetzung von etwa 70 % der CA-Carboxylgruppen erhalten wurden. Der durchschnittliche Durchmesser der **[PEG]-Mal** wurde auf $30 \pm 14 \mu\text{m}$ bestimmt und ergab eine leichte Inhomogenität hinsichtlich der Partikelgröße. Diese ist im Rahmen der Synthese PEG-basierter SCPs mit Durchmessern zwischen 20 - 100 μm jedoch nicht ungewöhnlich.^[266]

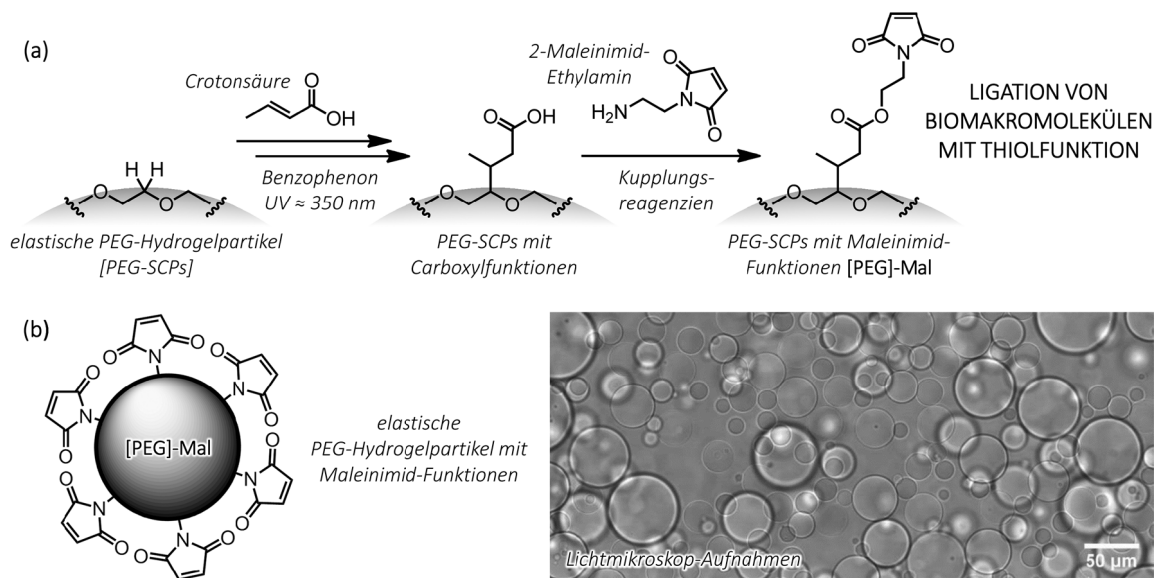


Abbildung 3.27. Funktionalisierung elastischer PEG-Hydrogelpartikel mit Maleinimid-Funktionen (a): Die Bestrahlung von PEG-SCPs mit UV-Licht in Gegenwart von Benzophenon ermöglicht postsynthetisch die Umsetzung mit Crotonsäure (CA, engl. *crotonic acid*) zu carboxylfunktionalisierten Mikropartikeln.^[257] Im nachfolgenden Modifizierungsschritt werden diese mittels 2-Maleinimid-Ethylamin in PEG-SCPs mit Maleinimid-Funktionen **[PEG]-Mal** überführt. Lichtmikroskopische Aufnahmen von **[PEG]-Mal** mit einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von $30 \pm 14 \mu\text{m}$ und einen Funktionalisierungsgrad $\text{FD} [\text{Mal}] = 36 \pm 5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (b).

Postsynthetische Modifikationen mit niedermolekularen organischen Molekülen haben in der Regel keinen Einfluss auf die Elastizität der PEG-Hydrogelpartikel.^[347] Somit können funktionalisierte PEG-SCPs selektiv mit biomakromolekularen Strukturen verbunden und dadurch komplexe Adhäsionsprozesse auf verschiedenen Oberflächen charakterisiert werden.^[258, 259, 261]

3.3.2 MALEINIMID-FUNKTIONALISIERTE PEG-SCPs ALS MECHANISCHE SONDEN FÜR ENZYMATISCH AKTIVIERBARE ADHÄSIONSDOMÄNEN

Auf der Grundlage Maleinimid-funktionalisierter PEG-SCPs **[PEG]-Mal** wurde ein analytisches Konzept entwickelt, um die Wechselwirkungen enzymatisch aktivierbarer Adhäsionsdomänen zu quantifizieren. Für die Integration der SCP-Methode in das in **Kapitel 3.1** (vgl. Seite 29) vorgestellte Aktivierungskonzept wurde zunächst ein enzymresponsives Cystein-Peptid **PEP^{RhB}** entwickelt. Dieses sollte in einer Thiol-Maleinimid-Ligation an die elastischen Kolloide **[PEG]-Mal** gebunden werden (vgl. **Abbildung 3.28a**). Die modulierbaren Hydrogelsonden sollten anschließend mittels einer spezifischen Protease aktiviert werden, um die adhäsiven Eigenschaften der immobilisierten Vorläufer **PEP^{RhB}** als Bindungsdomänen **PEP^{TBP}** freizugeben. Die aktivierten Systeme sollten anschließend mittels RCM vermessen werden, um den enzymatisch induzierten Adhäsionsprozess quantitativ erfassen zu können.

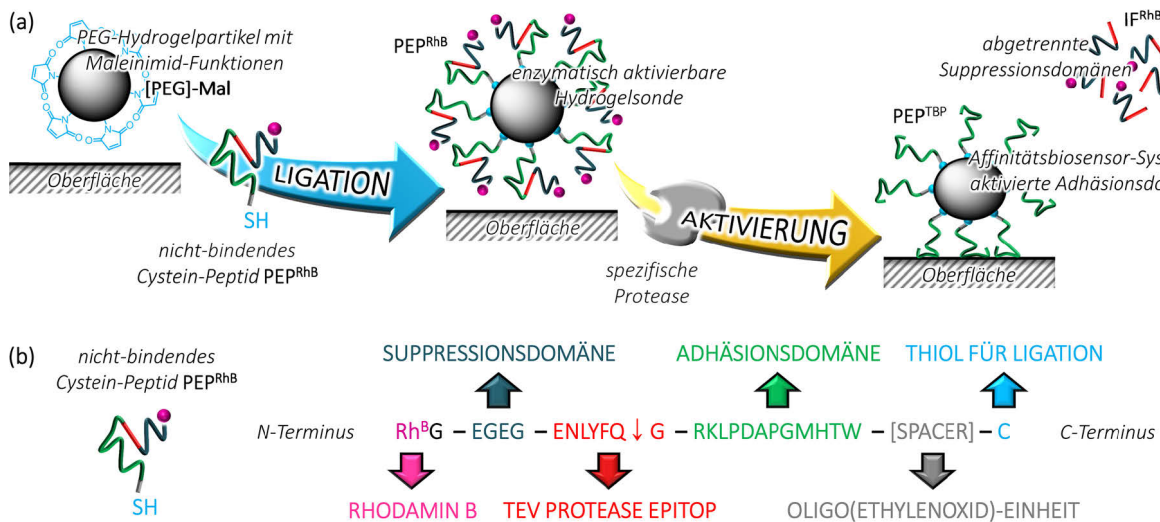


Abbildung 3.28. Konzept elastischer Hydrogelpartikel als mechanische Biosensor-Systeme für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen (a): Die Ligation eines nicht-bindenden Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** an ein Maleinimid-PEG-SCP **[PEG]-Mal** führt zu einer enzymatisch aktivierbaren Hydrogelsonde. Durch die Prozessierung mittels einer spezifischen Protease werden die adhäsiven Eigenschaften des immobilisierten Vorläufers als Binder **PEP^{TBP}** zurückgebildet und ein Affinitätsbiosensor-System für aktivierte Adhäsionsdomänen erzeugt. Aufbau des nicht-bindenden Cystein-Peptides **Rh^BG-(EG)₂-ENLYFQ↓G-RKLPDAPGMHTW-[OEG]₂-C (PEP^{RhB})** auf Grundlage der Adhäsionsdomäne **TBP** (b): Die N-terminalen Glutaminsäure-Seitenketten dienen der Unterdrückung adhäsiver Wechselwirkungen. Die spezifische Erkennungssequenz **ENLYFQ↓G** der TEV Protease zwischen haftungsunterbindender Einheit und **TBP** ermöglicht die Abtrennung der Suppressionsdomäne **Rh^BG-(EG)₂-ENLYFQ (IF^{RhB})** zur Freisetzung der immobilisierten **G-RKLPDAPGMHTW-[OEG]₂-C (PEP^{TBP})** als Adhäsionsdomäne. Das Cystein erlaubt die kovalente Anbindung an **[PEG]-Mal** über den C-Terminus in einer Thiol-Maleinimid-Ligation. Der Fluorophor Rhodamin B (**Rh^B**) am N-Terminus eignet sich zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Peptidanbindung. Die Oligo(ethylenoxid)-Einheit zwischen Adhäsionsdomäne und Cystein erzeugt eine räumliche Distanz zwischen den funktionalen Peptiddomänen und der Sensoroberfläche.

Als Vorlage für biotransformierbare Peptid-PEG-SCPs dienten die Erkenntnisse hinsichtlich der Prozessierung des nicht-bindenden Biokonjugates **S4-PEG**, dessen aktivierbare Oberflächenhaftung auf der Adhäsionsdomäne **TBP** beruhte (vgl. **Kapitel 2.6.2** Seite 22).^[233] Dementsprechend wurde die Sequenz Rh^BG-(EG)₂-ENLYFQ↓G-RKLPDAPGMHTW-[OEG]₂-C als potentiell nicht-adhäsiver Vorläufer **PEP^{RhB}** entworfen, wobei die Haftungseigenschaften von **TBP** durch Glutaminsäure-Reste am N-Terminus unterdrückt werden sollten (vgl. **Abbildung 3.28b**). Wie zuvor sollte die spezifische Erkennungssequenz ENLYFQ↓G der TEV Protease eine Abtrennung der Suppressionsdomäne Rh^BG-(EG)₂-ENLYFQ (**IF^{RhB}**) ermöglichen, während die Adhäsionsdomäne in Form von G-RKLPDAPGMHTW-[OEG]₂-C (**PEP^{TBP}**) an der Sonde verbleibt. Für die Immobilisierung von **PEP^{RhB}** wurde am C-Terminus die proteinogene Aminosäure Cystein integriert, dessen Thiol-Seitenkette die selektive Ligation an die Maleinimid-Funktionen der PEG-SCPs **[PEG]-Mal** erlaubt. Die N-terminale Markierung der nicht-bindenden Peptidsequenz mit dem Fluorophor Rhodamin B (Rh^B) sollte dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der kovalenten Peptidanbindung dienen. Zusätzlich wurde zwischen Cystein und Adhäsionsdomäne **TBP** ein Oligo(ethylenoxid) **OEG** als zweifache Wiederholungseinheit eingefügt. Diese erzeugte eine räumliche Distanz zwischen den funktionalen Peptidomänen und der Sondenoberfläche. Insbesondere die spezifische Erkennungssequenz der TEV Protease sollte dadurch für das makromolekulare Enzym besser zugänglich sein und die Aktivierung des immobilisierten Substrates **PEP^{RhB}** begünstigen. Die konformell flexible Oligo(ethylenoxid)-Einheit **OEG** wurde für die automatisierte festphasengebundene Peptidsynthese als Fmoc-geschütztes Derivat **Fmoc-OEG-COOH** ausgehend von dem symmetrischen 2,2'-(Ethyldendioxy)bis(ethylamin) hergestellt (vgl. **Kapitel 5.4.2** Seite 118).^[351, 352]

Zusätzlich zu **PEP^{RhB}** wurde die durch die enzymatische Aktivierung der Hydrogelsonden **[PEG]-PEP^{RhB}** freigegebene Adhäsionsdomäne **PEP^{TBP}** als chemisch analoge Peptidsequenz **PEP^{TBP*}** hergestellt. Dieses sollte in entsprechenden Referenzexperimenten ebenfalls kovalent an die Sonden **[PEG]-Mal** immobilisiert werden, um einen direkten Vergleich der adhäsiven Interaktionen von synthetisch erzeugten und enzymatisch aktivierten Biosensor-Systemen gegenüber Glasoberflächen zu ermöglichen. Nach der Synthese wurden die thiolhaltigen Strukturen durch Behandlung mit TFA/H₂O/TES/EDT (94:2:2:2, v/v/v/v) simultan vom polymeren Träger abgespalten und die Aminosäure-Seitenketten entschützt. Anschließend wurden die Cystein-Peptide mittels Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) reduziert und zur Abtrennung von Abbruch- und Auslassungssequenzen semipräparativ aufgereinigt.

Die Verwendung des linearen 12-meres **TBP** als Modellpeptid für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen zur Umsetzung des SCP-basierten Ansatzes hat einen entscheidenden Vorteil. Die mittels Phagen-Display selektierte Sequenz adhäriert nicht nur auf Titandioxid-Oberflächen, sondern ist ebenso ein spezifischer Binder für Siliciumdioxid.^[234] Folglich ist – im Vergleich zu anderen Systemen – eine zusätzliche Modifikation der standardmäßig für RCM-Messungen verwendeten Glasoberflächen nicht erforderlich, um die Wechselwirkungen enzymatisch aktivierter **[PEG]-PEP^{RhB}** bzw. adhäsiver **[PEG]-PEP^{TBP}** charakterisieren zu können.^[258, 259, 261] Die Oberflächenhaftung der linearen Peptidsequenz **TBP** auf SiO₂ wurde durch QCM-D-Experimente des synthetischen Biokonjugat-Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** nachgewiesen (vgl. **Kapitel 5.7.12** Seite 167). Ebenso konnte die Unterdrückung der adhäsiven Eigen-

schaften von **TBP** durch die anionische Suppressionsdomäne (EG)₂ an Hand des Aktivierungssubstrates **S4-PEG** bestätigt. Dieser Sachverhalt eröffnete vielversprechende Perspektiven, mit Hilfe der Adhäsionsdomäne **TBP** ein auf PEG-SCPs basierendes Affinitätsbiosensor-System für die Analyse enzymatisch aktivierbarer Adhäsionsprozesse auf Siliciumdioxid-Oberflächen zu entwickeln. Der erste Schritt zur Umsetzung des vorgestellten Aktivierungskonzeptes beinhaltete die Immobilisierung des potentiell nicht-bindenden Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** an die **[PEG]-Mal** über die Thiol-Maleinimid-Ligation.

3.3.3 IMMOBILISIERUNG ENZYMATISCH AKTIVIERBARER ADHÄSIONSDOMÄNEN

3.3.3.1 Strategien zur Steuerung der Peptidbeladung Maleinimid-funktionalisierter PEG-SCPs

Eine der Zielvorgaben des Teilprojektes Maleinimid-funktionalisierter PEG-SCPs **[PEG]-Mal** als mechanische Sonden für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen umfasste die Synthese enzymresponsiver Hydrogelsonden mit verschiedenen Funktionalisierungsgraden an **PEP^{RhB}**. Die Untersuchung der Adhäsionsenergien der Systeme mittels RICH in Abhängigkeit der Peptidbeladung sollte dazu beitragen, die komplexen Zusammenhänge zwischen multivalenten Oberflächenkontakten und adhäsiven Wechselwirkungen aufzuklären. Die Beladung von **[PEG]-Mal** mit Cystein-Peptiden kann experimentell über drei verschiedene Strategien gesteuert werden. Hier besteht die Möglichkeit, die Anzahl an Verknüpfungspunkten bereits während des ersten Schrittes zur postsynthetischen Modifikation der PEG-SCPs mit Crotonsäure vorzugeben (vgl. **Kapitel 3.3.1** Seite 83). Durch den photochemischen Prozess können Hydrogelpartikel mit niedrigem, mittlerem oder hohem Funktionalisierungsgrad an Carboxylgruppen FD [COOH] generieren werden.^[262] So kann unter der Annahme von definierten Umsatzraten hinsichtlich der Kupplungsreaktion immobilisierter CA-Carboxylfunktionen mit 2-Maleinimid-Ethylamin sowie der Thiol-Maleinimid-Ligation die finale Beladung mit Cystein-Peptiden FD [Peptid] eingestellt werden. Vorarbeiten von SOPHIE LIEBERT im Rahmen der Diplomarbeit *Elastische Kolloidpartikel als Sonden für die Analyse enzymatisch-aktivierbarer Adhäsion* hatten jedoch ergeben, dass höhere Funktionalisierungsgrade an synthetischer Binder-Referenz **PEP^{TBP*}** die adhäsiven Interaktionen mit Glasoberflächen nicht zwingend verstärken müssen.^[353] Vielmehr zeigten sich mit zunehmendem FD [**PEP^{TBP*}**] eine Verminderung der Adhäsionsenergien. Daher wurde vermutet, dass bei einer zu hohen Dichte von **PEP^{TBP*}** an den PEG-SCPs elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den immobilisierten Adhäsionsdomänen auftreten können, wodurch die Ausbildung multivalenter Oberflächenkontakte mit SiO₂ verhindert wird. Daher sollten für die hier durchgeführten Ligationsexperimente bevorzugt **[PEG]-Mal** mit einem niedrigen Funktionalisierungsgrad an Maleinimiden verwendet werden. Weiterhin sollte eine geringere Dichte der Cystein-Peptide **PEP^{RhB}** bzw. **PEP^{TBP}** auf der Partikeloberfläche sowohl die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den gebundenen Peptide minimieren als auch die Zugänglichkeit der Erkennungssequenz ENLYFQ↓G von **PEP^{RhB}** für die Aktivierung durch die TEV Protease begünstigen.

Die zweite Variante zur Steuerung der Peptidbeladung bei definiertem FD [Mal] beruht auf der Verwendung verschiedener Äquivalente (Äq.) an Cystein-Peptid. Hierfür wird entsprechend

des FD [Mal] mit verschiedenen Peptidmengen im Unter- und Überschuss gearbeitet und so der maximal mögliche Funktionalisierungsgrad FD [Peptid] festgelegt. Als dritte Möglichkeit kann der FD [Peptid] über eine Konkurrenzreaktion von Cystein-Peptiden mit einer weiteren Thiol-Spezies reguliert werden. Dabei werden **[PEG]-Mal** mit einem festen FD [Mal] im Überschuss mit verschiedenen Verhältnissen von Cystein-Peptid und niedermolekularem Thiol behandelt. Beide experimentelle Ansätze wurden im Rahmen des Teilprojektes hinsichtlich ihrer Effizienz zur Immobilisierung von Cystein-Peptiden an **[PEG]-Mal** untersucht.

3.3.3.2 Entwicklung einer experimentellen Prozedur

Für die thiolreaktiven **[PEG]-Mal** mit einem definierten Funktionalisierungsgrad FD [Mal] als Grundlage wurde eine experimentelle Prozedur entwickelt, um das Konzept elastischer PEG-SCPs als mechanische Sonden für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen experimentell umsetzen zu können (vgl. **Abbildung 3.29**). Diese sollte es zum einen erlauben, den Ligationsfortschritt des enzymresponsiven Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** an **[PEG]-Mal** in Abhängigkeit von der Zeit zu bestimmen. Zum anderen sollte die Vorgehensweise eine Bestimmung der Adhäsionsenergien sowohl der potentiell nicht-bindenden als auch aktivierten **[PEG]-PEP^{RhB}** mit enzymatisch freigegebenen Adhäsionsdomänen **PEP^{RhB}** ermöglichen.

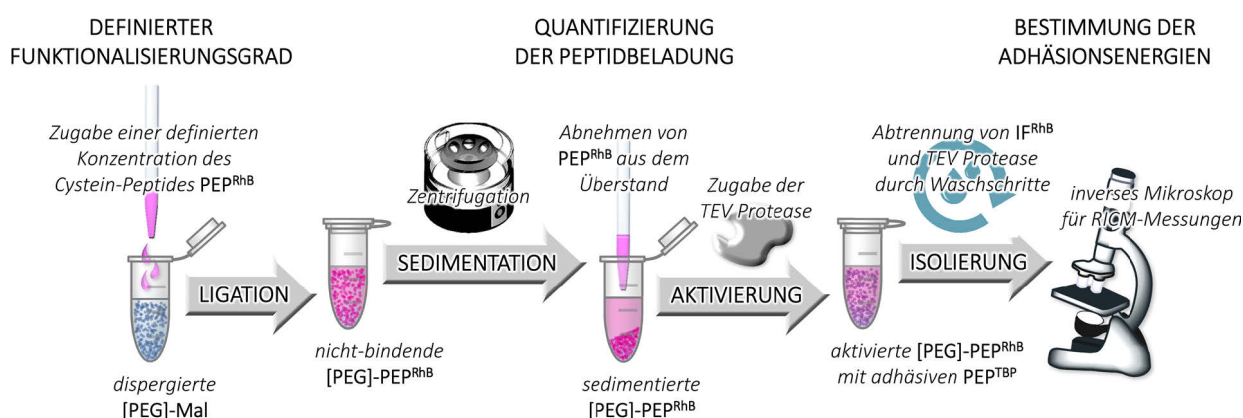


Abbildung 3.29. Experimentelle Prozedur zur Umsetzung des Konzeptes elastischer PEG-SCPs als Biosensor-Systeme für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen: Zur Immobilisierung wird eine gepufferte Ligationslösung des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** mit einer definierten Konzentration zu einer Dispersion Maleinimid-funktionalisierter PEG-SCPs **[PEG]-Mal** mit einem definierten Funktionalisierungsgrad FD [Mal] gegeben. Die nicht-bindenden **[PEG]-PEP^{RhB}** werden durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand zur Quantifizierung der relativen Peptidbeladung FD [**PEP^{RhB}**] [%] und des finalen Funktionalisierungsgrades FD [**PEP^{RhB}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] abgenommen. Die **[PEG]-PEP^{RhB}** werden mittels geeigneter Waschschrte in Protease-Puffer überführt und durch die TEV Protease aktiviert. Die abgespaltenen Suppressionsdomänen **IF^{RhB}** und das Enzym werden nach der Aktivierung durch weitere Waschschrte abgetrennt und die aktivierten **[PEG]-PEP^{RhB}** mit adhäsiven **PEP^{TBP}** für RCM-Messungen zur Bestimmung der Adhäsionsenergien isoliert.

Zur Immobilisierung des Cystein-Peptides wurde eine definierte Konzentration von **PEP^{RhB}** in einer für Thiol-Maleinimid-Ligationen geeigneten Pufferlösung aufgenommen und zu einer Dispersion von **[PEG]-Mal** mit definiertem Funktionalisierungsgrad FD [Mal] gegeben. Zu festgelegten Zeitpunkten sowie nach der Ligation wurden die potentiell nicht-bindenden Hydrogelpartikel **[PEG]-PEP^{RhB}** durch Zentrifugation sedimentiert und entsprechende Aliquote aus

dem Überstand entnommen. Durch eine quantitative Analyse der abnehmenden Konzentrationen von **PEP^{RhB}** mittels analytischer RP-UHPLC wurden die relativen Peptidbeladungen $FD [PEP^{RhB}] [\%]$ sowie der finale Funktionalisierungsgrad $FD [PEP^{RhB}] [\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}]$ ermittelt. Für die Bestimmung des letzteren wurden die nicht-kovalent gebundenen Cystein-Peptide **PEP^{RhB}** durch wiederholtes Waschen abgetrennt und der $FD [PEP^{RhB}] [\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}]$ entsprechend der nicht umgesetzten Peptidmengen korrigiert. Ein Teil der nicht-adhäsiven **[PEG]-PEP^{RhB}** wurde für RCM-Messungen durch wiederholtes Waschen in einen für Bindungsstudien geeigneten Puffer überführt. Die verbleibenden **[PEG]-PEP^{RhB}** wurden in Protease-Puffer aufgenommen und mittels TEV Protease behandelt. Die abgespaltenen Suppressionsdomänen **IF^{RhB}** und das Enzym wurden nach der Aktivierung durch weitere Waschschrte abgetrennt und die aktivierten **[PEG]-PEP^{RhB}** mit den immobilisierten Peptid-Bindern **PEP^{TBP}** zur Bestimmung der Adhäsionsenergien isoliert.

In ersten Vorarbeiten wurden die Ligationsreaktionen zwischen Cystein-Peptid **PEP^{RhB}** und Maleinimid-funktionalisierten PEG-SCPs **[PEG]-Mal** in einem 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) durchgeführt und der Ligationsfortschritt mittels analytischer RP-UHPLC-Messungen nachvollzogen. Dabei zeigten Überstandsmessungen nach 4 Stunden bereits eine partielle Oxidation des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** zum korrespondierenden Disulfid **[PEP^{RhB}]₂** zu etwa 13 % entsprechend des Verhältnisses der Signalfächen von oxidiert und nicht-oxidiert Spezies (vgl. **Kapitel 5.8.2.1** Seite 170). Die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen durch die Oxidation mit Luftsauerstoff vor allem in gelöster Form ist für Cystein-Peptide bekannt^[354] und für die Effektivität der Immobilisierung von **PEP^{RhB}** an **[PEG]-Mal** von Nachteil. Das oxidierte Cystein-Peptid **[PEP^{RhB}]₂** kann im Vergleich zu der freien Sulfhydrylgruppe der nicht-oxidierten Spezies nicht mehr zu einem Thiolat-Anion dissoziiert werden, dessen nukleophile Eigenschaften die selektive Addition an Maleinimide ermöglicht.^[355]

Die durch Disulfidbrückenbindungen blockierten Thiol-Funktionen können mittels verschiedener Reduktionsmittel zurückgebildet werden. Neben Dithiothreitol (DTT) oder 2-Mercaptoethanol (2ME) gilt TCEP als effizient reduzierendes Reagenz für oxidierte Cystein-Peptide über einen weiteren pH-Bereich.^[356] Obwohl TCEP im Vergleich zu DTT und 2ME keine Sulfhydrylgruppe enthält, konnte in einigen Studien dennoch eine Reaktivität des Phosphins gegenüber Maleinimid-Funktionen beobachtet werden.^[357-359] Dabei wird TCEP unter Ausbildung einer zwitterionischen Spezies an die aktivierte Doppelbindung des Maleinimides addiert.^[360] Unter leicht basischen Bedingungen erfolgt die Reduktion des Intermediates zu dem entsprechenden Succinimid.^[359] Dessen ungeachtet beschreiben die Mehrheit von Publikationen und Standardprotokollen mit biochemischem Kontext die erfolgreiche Umsetzung von Thiol-Maleinimid-Ligationen ohne vorhergehende Abtrennung von TCEP.^[355, 361] Vor allem in wässrigen Lösungen kann das Reduktionsmittel der Disulfidbildung thiolhaltiger Verbindungen während der Reaktion nachhaltig vorbeugen. Im Hinblick auf eine effiziente Immobilisierung von **PEP^{RhB}** an **[PEG]-Mal** wurden die Konsequenzen einer stetigen Oxidation des Cystein-Peptides in wässrigen Lösungen gegen eine mögliche Exponierung der partikelgebundenen Maleinimide durch eine Konkurrenzreaktion mit TCEP abgewogen. Wegen der nachweislich zügigen Disulfidbildung von **PEP^{RhB}** zu **[PEP^{RhB}]₂** auch in entgastem Ligationspuffer wurde eine erfolgreiche Peptidanbindung in Gegenwart des Reduktionsmittels zur Prävention der Peptid-

oxidation als höher bemessen. Aufgrund der umfassend diskutierten Voruntersuchungen sollten sachdienliche Peptidbeladungen bzw. Funktionalisierungsgrade FD [PEP^{RhB}] erzielt werden können.

3.3.3.3 Quantifizierung von Peptidbeladung und Funktionalisierungsgrad

Für die quantitativen Untersuchungen wurden PEG-SCPs [PEG]-Mal mit einem niedrigen Funktionalisierungsgrad FD [Mal] = $36 \pm 5 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ verwendet. Als Ligationsmedium diente ein entgaster 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mit 2 M Guanidinhydrochlorid (pH 7.0) [Gu·HCl]. Das Denaturierungsmittel Gu·HCl^[362] wurde hinzugefügt, um die Löslichkeit von PEP^{RhB} zu verbessern und unspezifische Wechselwirkungen sowohl zwischen den Peptidsequenzen als auch mit den Mikropartikeln zu minimieren. Die Umsetzung von [PEG]-Mal mit verschiedenen Mengen PEP^{RhB} zwischen 0.50 Äq. und 1.50 Äq. erfolgte unter Verwendung eines fünffachen Überschusses TCEP bezogen auf die Konzentration an eingesetztem bzw. theoretisch berechnetem Cystein-Peptid (vgl. **Tabelle 3.8**). Die realen Äquivalente PEP^{RhB} wurden an Hand konzentrationskorrigierter Stammlösungen direkt zu Beginn der Experimente ermittelt. Zur Bestimmung dieser sowie der Peptidanbindung zu festgelegten Zeitpunkten wurden nach der Sedimentation der Mikropartikel entsprechende Aliquote aus dem Überstand entnommen und mittels RP-UHPLC vermessen. Das abnehmende UV-Vis-Signal des Cystein-Peptides PEP^{RhB} ermöglichte eine indirekte Quantifizierung bedingt durch den linearen Zusammenhang zwischen Signalfläche und Konzentration. Durch eine geeignete Kalibrierungsreihe für PEP^{RhB} in Gegenwart von TCEP konnte auf den Verbrauch des Cystein-Peptides geschlossen und die relativen Peptidbeladungen FD [PEP^{RhB}] [%] der gebildeten [PEG]-PEP^{RhB} sowie die finalen Funktionalisierungsgrade FD [PEP^{RhB}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] ermittelt werden.

Tabelle 3.8. Reaktionsansätze zur Immobilisierung verschiedener Äquivalente des Cystein-Peptides PEP^{RhB} an Maleinimid-funktionalisierte PEG-SCPs [PEG]-Mal mit einem Funktionalisierungsgrad FD [Mal] = $36 \pm 5 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ in Gegenwart von TCEP in fünffachem Überschuss – mit Ausnahme für die Verwendung von 5.00 Äq. PEP^{RhB} – bezogen auf die Konzentration an PEP^{RhB}. Die durch analytische RP-UHPLC-Messungen ermittelten Umsatzraten von PEP^{RhB} in Abhängigkeit von der Zeit wurden als relative Peptidbeladungen FD [PEP^{RhB}] [%] sowie als final erzielte Funktionalisierungsgrade FD [PEP^{RhB}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] für die gebildeten [PEG]-PEP^{RhB} bestimmt.

PEP ^{RhB}	C _{START} [PEP ^{RhB}] [μM]		TCEP c [μM]	FD [PEP ^{RhB}] [%]				FD [PEP ^{RhB}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]	
	berechnet	gemessen		1 h	4 h	24 h	24 h ^a	theoretisch ^b	erhalten
0.50 Äq.	54	48	270	4	9	14	13	16	5
1.00 Äq.	108	106	540	13	19	26	24	35	9
1.50 Äq.	162	163	810	10	24	43	38	36	14
5.00 Äq.	540	479	–	–	–	71	66	36	24

^a Die angegebenen Werte schließen die Waschschriffe aus **Protokoll A** (vgl. **Tabelle E10** Seite 171) zur Abtrennung nicht-kovalent gebundener Peptidspezies nach der Immobilisierung ein. ^b Der theoretische FD [PEP^{RhB}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] wurde entsprechend der gemessenen Ausgangskonzentration C_{START} [PEP^{RhB}] [μM] berechnet. Gradient RP-UHPLC: 10 – 70 % Acetonitril in H₂O (0.1 % HCOOH, v/v/v), 4 min, 210 nm.

Die analytischen RP-UHPLC-Messungen ergaben eine Abhängigkeit der erzielten relativen Peptidbeladungen FD [PEP^{RhB}] [%] sowohl von den eingesetzten Äquivalenten PEP^{RhB} als auch von der Ligationsdauer. Auch noch über einem Zeitraum von 4 Stunden hinaus konnte für die drei Reaktionsansätze eine signifikante Erhöhung des FD [PEP^{RhB}] [%] verzeichnet werden. Für die finale Umsatzbestimmung nach 24 Stunden wurden nicht-kovalent gebundene Peptidspezies durch mehrfaches Waschen entfernt und der FD [PEP^{RhB}] [%] entsprechend der nicht umgesetzten Mengen PEP^{RhB} korrigiert. Letztendlich zeigte sich eine deutliche Abweichung zwischen den theoretischen und erhaltenen Funktionalisierungsgraden FD [PEP^{RhB}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] insbesondere für die unterschüssigen und äquimolaren Konzentrationen von 0.50 Äq. bzw. 1.00 Äq. PEP^{RhB} . Lediglich unter Verwendung von 1.50 Äq. des Cystein-Peptides wurde ein moderater Funktionalisierungsgrad FD [PEP^{RhB}] = 14 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ für [PEG]- PEP^{RhB} erzielt. Hierbei konnten bis zu 38 % der Maleinimid-Funktionen der PEG-SCPs mit PEP^{RhB} umgesetzt werden. Daher wurde zusätzlich zu der beschriebenen Experimentierreihe eine weitere Ligationsreaktion mit 5.00 Äq. PEP^{RhB} ohne die vorherige Zugabe von TCEP angesetzt und die Immobilisierungseffizienz ermittelt. Zum einen sollte dadurch verhindert werden, dass das bisher präventiv verwendete Reduktionsmittel an die partikelgebundenen Maleinimide addieren kann und möglicherweise doch zu einem Funktionsverlust führt. Zum anderen sollte durch den fünffachen Überschuss an Cystein-Peptid die maximal mögliche Peptidbeladung bestimmt werden. So wurde für den Reaktionsansatz nach einem Zeitraum von 24 Stunden eine relative Peptidbeladung von 66 % und ein Funktionalisierungsgrad FD [PEP^{RhB}] = 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ final quantifiziert. Im Vergleich zu der Ligation mit 1.50 Äq. PEP^{RhB} konnte die Anzahl an nicht umgesetzten Maleinimiden der Hydrogelpartikel [PEG]-Mal erfolgreich um etwa 28 % verringert werden. Nun galt es zu klären, inwiefern der hier ermittelte FD [PEP^{RhB}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] tatsächlich der oberen Grenze zur Immobilisierung des Cystein-Peptides entspricht.

Ein weiterer Faktor, den es bei Maleinimid-basierten Ligationen zu berücksichtigen gilt, ist die Anfälligkeit der heterocyclischen Funktionalität gegenüber hydrolytischen Ringöffnungsreaktionen.^[363] Insbesondere unter wässrigen Bedingungen sind Maleinimide nur begrenzt hydrolysestabil^[364] und bilden mit der Zeit die entsprechend linearen Maleinsäure-Derivate, welche nicht mehr von freien Thiolen adressiert werden können. Diskussionen mit den Kooperationspartnern Prof. Dr. STEPHAN SCHMIDT und Prof. Dr. LAURA HARTMANN ergaben, dass die Hydrolyseempfindlichkeit der partikelgebundenen Maleinimide auch in dem zur Lagerung der [PEG]-Mal dienenden Lösungsmittel *N,N*-Dimethylformamid (DMF) nicht zu unterschätzen ist. Da die für die bisherigen Ligationsexperimente verwendeten [PEG]-Mal erst Tage nach der Partikelsynthese mit Cystein-Peptiden umgesetzt wurden, konnte ein Funktionsverlust durch Ringöffnungsreaktionen nicht ausgeschlossen werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass die maximale Peptidbeladung noch nicht erreicht worden war. An die Resultate und gewonnenen Erkenntnisse anknüpfend wurde eine weitere Serie von Immobilisierungsansätzen mit frisch präparierten [PEG]-Mal durchgeführt. Um den Zeitraum zwischen Maleinimid-Funktionalisierung und Peptid-Ligation auf ein Minimum zu reduzieren, erfolgte die relativ zeitaufwändige Bestimmung von FD [Mal] mittels TBO-Titration^[349, 350] erst nachdem die Ligationsreaktionen angesetzt wurden. Der zur Berechnung der Peptidkonzentrationen erforderliche FD [Mal] wurde an Hand laborbekannter Umsetzungsraten carboxyfunctionalisierter

PEG-SCPs – hier FD [COOH] = $58 \pm 1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ – mit etwa 80 % auf ungefähr $46 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ abgeschätzt. Der reale Funktionalisierungsgrad der **[PEG]-Mal** fiel mit FD [Mal] = $35 \pm 3 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ etwas geringer aus als erwartet. Folglich wurde mit leicht höheren Äquivalenten des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** gearbeitet.

Wie bereits in **Kapitel 3.3.3.1** (vgl. Seite 87) beschrieben, kann die Peptidbeladung bzw. der Peptid-Funktionalisierungsgrad über eine Konkurrenzreaktion von Cystein-Peptiden mit einer weiteren Thiol-Spezies gesteuert werden. Zur Prüfung dieser Strategie wurden die **[PEG]-Mal** mit verschiedenen Verhältnissen des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** und dem niedermolekularen Thiol 2ME im Überschuss behandelt. Gleichzeitig wurde auf den Zusatz von TCEP als Reduktionsmittel verzichtet. In **Tabelle 3.9** sind die relativen Peptidbeladungen FD [**PEP^{RhB}**] [%] sowie die final erzielten Funktionalisierungsgrade FD [**PEP^{RhB}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] unter Verwendung von 10 %, 50 % und 100 % **PEP^{RhB}** bezogen auf eine Gesamtmenge von theoretisch eingesetzten 5.00 Äq. an Thiol-Spezies nach 24 Stunden angegeben.

Tabelle 3.9. Reaktionsansätze zur Immobilisierung verschiedener Verhältnisse des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** und der Thiol-Spezies 2ME im Überschuss an Maleinimid-funktionalisierte PEG-SCPs **[PEG]-Mal** mit einem Funktionalisierungsgrad FD [Mal] = $35 \pm 3 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$. Durch analytische RP-UHPLC-Messungen wurden die relativen Peptidbeladungen FD [**PEP^{RhB}**] [%] sowie die final erzielten Funktionalisierungsgrade FD [**PEP^{RhB}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] der gebildeten **[PEG]-PEP^{RhB}** bestimmt.

Bezeichnung	abgeschätzte Äq. PEP ^{RhB} /2ME	C _{START} [PEP^{RhB}] [μM]		FD [PEP^{RhB}] [%] 24 h ^a	FD [PEP^{RhB}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]	
		berechnet	gemessen		theoretisch ^b	erhalten
[PEG]-PEP^{RhB} [10 %]	0.50/4.50 Äq.	69	69	7	23	2
[PEG]-PEP^{RhB} [50 %]	2.50/2.50 Äq.	345	341	20	35	7
[PEG]-PEP^{RhB} [100 %]	5.00/0.00 Äq.	690	635	32	35	11

^a Die Ligationsreaktionen wurden nach **Protokoll B** (vgl. **Tabelle E11** Seite 173) durchgeführt. ^b Der theoretische FD [**PEP^{RhB}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] wurde entsprechend der gemessenen Ausgangskonzentration C_{START} [**PEP^{RhB}**] [μM] berechnet. Gradient RP-UHPLC: 10 – 70 % Acetonitril in H₂O (0.1 % HCOOH, v/v/v), 4 min, 210 nm.

Für die drei Reaktionsansätze wurden signifikante Unterschiede zwischen den theoretischen und erhaltenen Funktionalisierungsgraden FD [**PEP^{RhB}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] verzeichnet, obwohl mit frisch präparierten Maleinimid-funktionalisierten PEG-SCPs **[PEG]-Mal** gearbeitet worden war. Gemäß diesen Resultaten schien die hier gewählte Strategie auf Basis der Konkurrenzreaktion zwischen **PEP^{RhB}** und 2ME nicht dazu geeignet, die angestrebten Peptidbeladungen zu erhalten. Die geringen FD [**PEP^{RhB}**] [%] bzw. FD [**PEP^{RhB}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] unter Verwendung von 10 % bzw. 50 % **PEP^{RhB}** könnten dadurch erklärt werden, dass 2ME als niedermolekulare Thiol-Spezies sehr schnell an die leichter zugänglichen Maleinimid-Funktionen auf der Partikeloberfläche addieren kann. Dagegen unterliegt die kovalente Immobilisierung des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** mit einer molekularen Masse von $3678.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ an die **[PEG]-Mal** kinetisch limitierten Diffusionsprozessen.^[365] Folglich sollte der Reaktionsansatz mit **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] aufgrund der langen Ligationszeit von 24 Stunden dennoch zu einer hohen Umsetzung der partikelgebundenen Maleinimide durch **PEP^{RhB}** führen. Im Vergleich zu dem vorgehenden Experiment – bei welchem durch Verwendung von 5.00 Äq. **PEP^{RhB}** ein FD [**PEP^{RhB}**] = $24 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ erhalten

wurde – war der hier erzielte Funktionalisierungsgrad mit $FD [PEP^{RhB}] = 11 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ um etwa 50 % verringert. Da für die letzten Messungen der Einfluss hinsichtlich der Hydrolyseempfindlichkeit der Maleinimid-Funktionen ausgeschlossen wurde, galt es an dieser Stelle den gewählten Quantifizierungsansatz in Form von Überstandsmessungen zu hinterfragen.

Bereits während der Vorbereitung der Reaktionsansätze wurde beobachtet, dass die **PEG-Mal** insbesondere in wässrigen Lösungen an den Kunststoffoberflächen der Pipettenspitzen und Probengefäße hafteten, obwohl silikonbeschichtete Mikrozentrifugenröhrchen zur Ligation verwendet wurden. Dadurch war eine quantitative Handhabung der Hydrogelpartikel erschwert und führte zu Partikelverlusten durch die notwendigen Waschschriffe zur Einstellung der Ligationsbedingungen. Auch eine Verlängerung der Zentrifugationszeiten zur Sedimentation der Peptid-PEG-SCPs ergab diesbezüglich nur eine leichte Verbesserung. Für die zuletzt durchgeführte Messreihe wurde deshalb auf einen vollständigen Austausch des Lösungsmittels verzichtet. Hierfür wurden nach der Sedimentation der in DMF gelagerten Hydrogelpartikel definierte Mengen des Überstandes abgenommen und das Ligationsmedium 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) versetzt mit 2 M Gu·HCl (pH 7.0) zusammen mit Cystein-Peptid **PEP^{RhB}** hinzugegeben. So erfolgte die Immobilisierung von **PEP^{RhB}** an die **PEG-Mal** in einem Cosolvens aus organischem Lösungsmittel und wässrigem Ligationspuffer. Ungeachtet dieses praktikableren Vorgehens ist die Bestimmung der Peptidbeladungen $FD [PEP^{RhB}] [\%]$ bzw. des Funktionalisierungsgrades $FD [PEP^{RhB}] [\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}]$ über indirekte Methoden durch Überstandsmessungen nur begrenzt aussagekräftig. Alternativ sollte die Quantifizierung daher zukünftig über eine direkte Aminosäuren-Analyse der an PEG-SCPs gebundenen Peptidsequenzen durch den EDMAN-Abbau erfolgen.^[260]

Durch die Immobilisierung des enzymresponsiven Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** an Maleinimid-funktionalisierte PEG-SCPs **[PEG]-Mal** wurden elastische PEG-Hydrogelpartikel **[PEG]-PEP^{RhB}** erhalten, welche eine Charakterisierung der spezifischen Wechselwirkungen enzymatisch aktivierbarer Adhäsionsdomänen mit Siliciumdioxid-Oberflächen ermöglichen sollten. Zur Bestimmung der Adhäsionsenergien der mittels TEV Protease modulierbaren Affinitätsbiosensor-Systeme wurden die in **Kapitel 2.7.2** (vgl. Seite 26) beschriebene RICM-Technik herangezogen.

3.3.4 ADHÄSIONSENERGIEN ENZYMATISCH AKTIVIERTER ADHÄSIONSDOMÄNEN

In biologischen Systemen katalysieren Proteasen die Bindungsspaltungsreaktionen gelöster Substrate in wässrigen Medien. Die Enzyme können jedoch ebenso gegenüber an Heterophasen wie Harzen oder Glaspartikeln gebundenen Peptidsequenzen katalytisch aktiv sein, wie entsprechende Forschungen erst kürzlich zeigten.^[366, 367] Dabei wurde die enzymatische Reaktivität verschiedener Proteasen mit molekularen Massen von bis zu 90 kDa nachgewiesen. Somit sollte die Aktivierung der an PEG-SCPs immobilisierten Cystein-Peptide **PEP^{RhB}** durch die TEV Protease mit einer Molekülgröße von 27 kDa relativ problemlos möglich sein. Die enzymatische Aktivierung der modulierbaren Hydrogelpartikel **[PEG]-PEP^{RhB}** durch die TEV Protease erfolgte in Protease-Puffer. Hierfür wurde die Originalvorschrift (vgl. **Tabelle 3.2** Seite 34) entsprechend der molekularen Masse des immobilisierten **PEP^{RhB}** angepasst und die verschiedenen Reaktionsansätze von **[PEG]-PEP^{RhB}** aus **Tabelle 3.9** (vgl. Seite 92) mit jeweils

86 Units TEV Protease behandelt. Eine quantitative Analyse hinsichtlich der Aktivierungseffizienz war aufgrund der Partikelverluste durch die notwendigen Waschstschritte nach der Ligation und zur Vorbereitung der Proteolysebedingungen nicht möglich. Für eine Bestimmung der Konzentration an enzymatisch abgetrennter Suppressionsdomäne IF^{RhB} muss die Partikelkonzentration der entsprechenden Dispersion genau bekannt sein. Nach der Inkubation mit der TEV Protease wurden die aktivierten $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ ebenfalls sorgfältig gewaschen, um die haftungsunterdrückende Einheit und das Enzym vollständig zu entfernen.

Die RICM-Messungen der aktivierten und nicht-aktivierten $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ auf Glasoberflächen wurden von HANQING WANG durchgeführt. Als Bindungspuffer wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, engl. *phosphate-buffered saline*) bestehend aus 20 mM Natriumphosphat (pH 7.0) versetzt mit 154 mM NaCl verwendet. Das Salz diente der Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen den Peptidsequenzen und SiO_2 . Für die Reaktionsansätze $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [10 %] und $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [50 %] lagen die Adhäsionsenergien der aktivierten und nicht-aktivierten Peptid-PEG-SCPs in der gleichen Größenordnung mit Werten bis ungefähr $200 \mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ (vgl. **Tabelle 3.10**). Folglich konnten durch die Behandlung mit der TEV Protease die Haftungseigenschaften der Systeme nicht moduliert werden. Bedingt durch die hier angewendete Strategie, basierend auf der Konkurrenzreaktion mit 2ME verschiedene Peptidbeladungen zu erzielen, wurde womöglich vornehmlich die niedermolekulare Thiol-Spezies kovalent an die Hydrogelpartikel $[\text{PEG}]\text{-Mal}$ gebunden. Dementsprechend würden die als $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ deklarierten Reaktionsansätze keine immobilisierten Peptidsequenzen PEP^{RhB} aufweisen, welche durch die enzymatische Prozessierung die gewünschten Adhäsionsdomänen PEP^{TBP} freigegeben könnten.

Tabelle 3.10. Mittels RICM bestimmte Adhäsionsenergien W_{JKR} der enzymatisch aktivierten und nicht-aktivierten $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ durch Umsetzung Maleinimid-funktionalisierter PEG-SCPs $[\text{PEG}]\text{-Mal}$ mit verschiedenen Verhältnissen des Cystein-Peptides PEP^{RhB} und der Thiol-Spezies 2ME im Überschuss im Vergleich zu W_{JKR} der synthetisch erzeugten Bindungsreferenz $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{TBP}*}$ [100 %] auf Glasoberflächen.

Bezeichnung	abgeschätzte Äq. Peptid/2ME	FD [Peptid] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]	$W_{\text{JKR}} [\mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}]^{\text{a}}$	
			nicht-aktiviert	aktiviert ^b
$[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [10 %]	0.50/4.50 Äq.	2	157 ± 79	71 ± 19
$[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [50 %]	2.50/2.50 Äq.	7	158 ± 84	218 ± 32
$[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [100 %]	5.00/0.00 Äq.	11	162 ± 44	986 ± 62
$[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{TBP}*}$ [100 %]	5.00/0.00 Äq.	18 ^c	910 ± 189	

^a RICM-Messungen: 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mit 154 mM NaCl (PBS). ^b Bedingungen Proteolyse: **Protokoll C** (vgl. **Tabelle E13** Seite 174). ^c Bedingungen Ligation: **Protokoll B** (vgl. **Tabelle E11** Seite 173). Gradient RP-UHPLC: 5 – 50 % Acetonitril in H_2O (0.1 % HCOOH , v/v/v), 4 min, 210 nm.

Dagegen zeigte sich an Hand des Reaktionsansatzes $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [100 %] die Realisierbarkeit des Konzeptes elastischer PEG-Hydrogelpartikel als mechanische Biosensoren für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen. Während für die nicht-aktivierten $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [100 %] eine relativ geringe Adhäsionsenergie von $W_{\text{JKR}} = 162 \pm 44 \mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ gemessen wurde, konnten für die proteolytisch aktivierten Peptid-PEG-SCPs starke adhäsive Wechselwirkungen mit der anioni-

schen Oberfläche mit $W_{JKR} = 968 \pm 62 \mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ verzeichnet werden. **Abbildung 3.30a** zeigt die dazugehörigen RICM-Aufnahmen vor und nach der enzymatischen Biotransformation unter Ausbildung charakteristischer Kontaktflächen in Form konzentrischer Ringe. Die proteolytische Umsetzung der enzymresponsiven **PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] zu **[PEG]-PEP^{TBP}** wurden an Hand massenspektrometrischer Analysemethoden überprüft. Ein nach 16 Stunden Aktivierung aufgenommenes MALDI-ToF-MS-Spektrum zeigte die Bildung der enzymatisch freigesetzten Suppressionsdomäne **IF^{RhB}** als ein intensives Massensignal bei m/z 1668.2 in Form des Addukt-Ions $[M+H]^+$ (vgl. **Abbildung 3.30b**). Das Massensignal geringerer Intensität bei m/z 1878.6 konnte dem Addukt-Ion $[M+\alpha\text{CHCA}+\text{Na}]^+$ zugeordnet werden. Demnach wurde die Suppressionsdomänen **IF^{RhB}** erfolgreich mittels der TEV Protease von den **PEG]-PEP^{RhB}** abgetrennt und führte zu stark-bindenden **[PEG]-PEP^{TBP}**, deren Wechselwirkungen mit Glasoberflächen auf den immobilisierten Adhäsionsdomänen **PEP^{TBP}** beruhte.

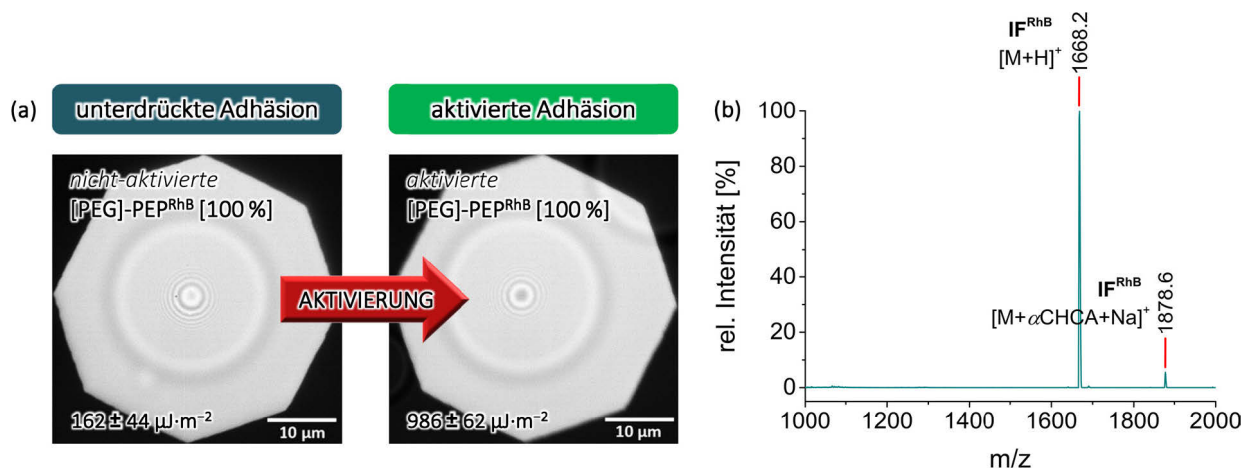


Abbildung 3.30. Quantitative und qualitative Analyse der enzymatischen Aktivierung von **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %]: RICM-Aufnahmen nicht-aktivierter und aktivierter **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] zur Bestimmung der Oberflächenflächenenergien W_{JKR} auf Glasoberflächen in PBS (a). Bedingungen Proteolyse: **Protokoll C** (vgl. **Tabelle E13** Seite 174). Das MALDI-ToF-MS-Spektrum nach 16 Stunden Aktivierung zeigt die Addukt-Ionen $[M+H]^+$ und $[M+\alpha\text{CHCA}+\text{Na}]^+$ der abgespaltenen Suppressionsdomäne **IF^{RhB}** bei m/z 1668.2 bzw. m/z 1878.6.

Neben der Bestätigung einer erfolgreichen enzymatischen Aktivierung der Hydrogelsonden **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] mittels MALDI-ToF-MS diente die qualitative Analyse der indirekten Verifizierung der kovalenten Peptidanbindung von **PEP^{RhB}** an die **[PEG]-Mal**. Jedoch wurde durch die massenspektrometrischen Messungen der verschiedenen Reaktionsansätze zur Darstellung von **[PEG]-PEP^{RhB}** auch die Vermutung bestätigt, dass für **[PEG]-PEP^{RhB}** [10 %] und **[PEG]-PEP^{RhB}** [50 %] das Cystein-Peptid **PEP^{RhB}** nicht immobilisiert werden konnte. Entsprechende Untersuchungen der Überstands- und Waschlösungen, welche nach einer Behandlung der Peptid-PEG-SCPs mit der TEV Protease erhalten wurden, konnte die Suppressionsdomäne **IF^{RhB}** nicht identifiziert werden. Ungeachtet dessen konnte auf Basis der für die aktivierten Hydrogelsonden **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] erzielten Adhäsionsenergie $W_{JKR} = 968 \pm 62 \mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ bedingt durch die Interaktionen der immobilisierten Adhäsionsdomäne **PEP^{TBP}** mit der negativ geladenen Siliciumdioxid-Oberfläche und dem massenspektrometrischen Nachweis der Biotransformation durch die TEV Protease ein vielversprechendes Affinitätsbiosensor-System für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen erhalten werden. Weiterhin ermöglichte eine

synthetisch erzeugte Bindungsreferenz **[PEG]-PEP^{TBP*}** [100 %] einen Vergleich der enzymatisch induzierten Adhäsionsenergie mit den nativen Haftungseigenschaften von **PEP^{TBP}**. Die entsprechenden Peptid-PEG-SCPs wurde durch Umsetzung von **[PEG]-Mal** mit 5.00 Äq. des adhäsiven Cystein-Peptides **PEP^{TBP*}** als chemisch analoge Peptidsequenz zu **PEP^{TBP}** hergestellt (**Protokoll B** vgl. **Tabelle E11** Seite 173). Hier konnte ein Peptid-Funktionalisierungsgrad von $FD [PEP^{TBP*}] = 18 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ erzielt werden (vgl. **Tabelle 3.10**). Darüber hinaus ergaben RCM-Messungen von **[PEG]-PEP^{TBP*}** [100 %] eine hohe Adhäsionsenergie $W_{JKR} = 910 \pm 189 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$, wodurch ausgeprägte Interaktionen von **PEP^{TBP*}** mit der Glasoberfläche nachgewiesen werden konnten. Gemäß der erzielten Werte für $FD [PEP^{TBP*}]$ und W_{JKR} führte die enzymatische Aktivierung des Affinitätsbiosensor-Systems **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] mit einem vergleichbaren Funktionalisierungsgrad von $FD [PEP^{RhB}] = 11 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ zu einer ebenso hohen Adhäsionsenergie durch **PEP^{TBP}** wie die synthetische Referenz **[PEG]-PEP^{TBP*}** [100 %].

Ein im Zusammenhang mit den quantitativen RCM-Messungen bisher nicht diskutiertes Resultat ist die Adhäsionsenergie $W_{JKR} = 162 \pm 44 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ des nicht-aktivierten Vorläufers **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %]. Aufgrund der Möglichkeit, dass das als nicht-bindendes Cystein-Peptid eingestufte **PEP^{RhB}** ebenfalls mit der Glasoberfläche interagieren könnte, müssen spezifische und unspezifische Wechselwirkungen voneinander differenziert betrachtet werden. Um zu klären, ob die erhaltene Adhäsionsenergie durch die immobilisierten Peptidsequenzen **PEP^{RhB}** oder die **[PEG]-Mal** als kolloidale Träger hervorgerufen wurden, wurden letztere ebenfalls mittels RCM untersucht. Dabei wurde für die Maleinimid-funktionalisierten PEG-SCPs eine Adhäsionsenergie von $W_{JKR} = 249 \pm 29 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ ermittelt. Unter physiologischen Bedingungen interagieren die entsprechend carboxylfunktionalisierten PEG-SCP-Vorläufer der **[PEG]-Mal** mit einer Adhäsionsenergie von unter $1 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ nur minimal mit Siliciumdioxid-Oberflächen.^[266] Folglich waren die für die nicht-aktivierten **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] gemessenen Wechselwirkungen auf das Sondenmaterial bzw. die thiolreaktiven Maleinimide zurückzuführen und von unspezifischem Charakter. Ebenfalls positiv zu bemerken ist, dass die nicht-bindenden **PEP^{RhB}** bzw. die eingeführten Suppressionsdomänen **IF^{RhB}** ihre angestrebte haftungsunterdrückende Funktion erfüllten und die unspezifischen Interaktionen der **[PEG]-Mal** um einen Betrag von $W_{JKR} = 87 \pm 73 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ reduzierten. Somit führte die Aktivierung von **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] und die dadurch freigegebenen Adhäsionsdomänen **PEP^{TBP}** zu spezifischen Wechselwirkungen mit Glasoberflächen, welche als effektive Adhäsionsenergie von $W_{\text{eff}} = 824 \pm 106 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ beziffert werden konnten (vgl. **Abbildung 3.31**).

Ein geeigneterer Vergleich für die Spezifität der adhäsiven Eigenschaften des aktivierten Affinitätsbiosensor-System **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] bzw. **PEP^{TBP}** stellt jedoch die Berücksichtigung möglicher Oberflächeninteraktionen der TEV Protease dar. Wie bereits im Zusammenhang mit sättigungsabhängigen QCM-D-Messungen enzymatisch aktivierter Biokonjugate beobachtet, zeigte das kommerziell erworbene Enzym eine leichte Oberflächenhaftung auf Titandioxid-Oberflächen in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration und der verwendeten Präparation (vgl. **Kapitel 3.1.3.1** Seite 42 bzw. **Kapitel 3.1.11** Seite 68). Um den Einfluss der Haftungseigenschaften der viralen Cysteinprotease bezüglich der enzymatisch aktivierten **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] bemessen zu können, wurden in einem entsprechenden Referenzexperiment die Maleinimid-funktionalisierten PEG-SCPs **[PEG]-Mal** mit 86 Units

TEV Protease behandelt (vgl. **Protokoll C Tabelle E13** Seite 174). Nach der Abtrennung des Enzyms durch geeignete Waschschrte wurde die Adhäsionsenergie in PBS mittels RCM auf $W_{JKR} = 404 \pm 20 \mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ bestimmt.

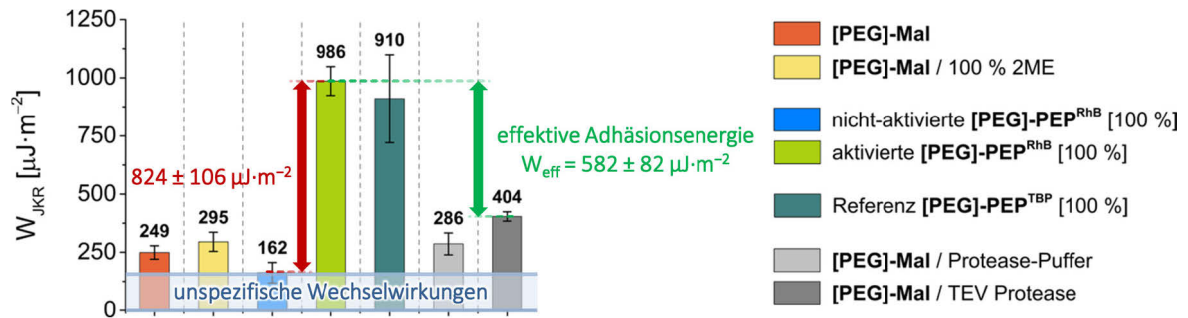


Abbildung 3.31. Säulendiagramm zur Bestimmung der effektiven Adhäsionsenergien W_{eff} enzymatisch aktivierter Adhäsionsdomänen an Hand der durch RCM-Messungen ermittelten Adhäsionsenergien W_{JKR} der aktivierten und nicht-aktivierten [PEG]-PEP^{RhB} [100 %] sowie der synthetisch erzeugten Referenz [PEG]-PEP^{TBP} [100 %] im Vergleich zu den W_{JKR} von [PEG]-Mal, welche mit den verschiedenen Lösungsmedien von Ligation und Aktivierung sowie der TEV Protease behandelt wurden.

Dieses Resultat zeigte, dass die TEV Protease mit der Siliciumdioxid-Oberfläche unspezifisch interagiert und darüber hinaus an dem Sondenmaterial haftete, obwohl die PEG-SCPs sorgfältig gewaschen wurden. Folglich sind nach enzymatischen Aktivierungsprozessen die Waschschrte zukünftig zu verschärfen. Dennoch wurden die spezifischen Wechselwirkungen des aktivierten Affinitätsbiosensor-Systems [PEG]-PEP^{RhB} [100 %] bzw. der Bindungsdomäne PEP^{TBP} auf einen beachtlichen Betrag von $W_{\text{eff}} = 582 \pm 20 \mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ beziffert. Die somit erzielte effektive Adhäsionsenergie entsprach in etwa der starken Oberflächenhaftung von an PEG-SCPs immobilisierten Poly-L-Lysin-Sequenzen mit $W_{JKR} = 700 \pm 190 \mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$.^[266] Bei einer vollständigen Abtrennung der TEV Protease von den aktivierten [PEG]-PEP^{RhB} [100 %] könnte das System die PLL-Wechselwirkungen mit Glasoberflächen sogar noch übertreffen. Somit wurde nachgewiesen, dass die enzyminduzierten Adhäsionsprozesse durch mechanisch verformbare PEG-Hydrogelpartikel interpretiert und die SCP-Methode erfolgreich in das Aktivierungskonzept integriert werden konnte.

3.3.5 TEILZUSAMMENFASSUNG

Durch das Einbeziehen elastischer PEG-Hydrogelpartikel als mechanische Sonden in ein materialwissenschaftliches Aktivierungskonzept konnten die spezifischen Wechselwirkungen enzymatisch aktivierbarer Adhäsionsdomänen mit Siliciumdioxid-Oberflächen erfasst werden. Die Immobilisierung des nicht-bindenden Cystein-Peptides PEP^{RhB} an Maleinimid-funkionalisierte PEG-SCPs [PEG]-Mal führte zu einem enzymresponsiven Affinitätsbiosensor-System [PEG]-PEP^{RhB} [100 %] mit einem Funktionalisierungsgrad $FD[\text{PEP}^{\text{RhB}}] = 11 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$. Mittels der TEV Protease wurden die [PEG]-PEP^{RhB} [100 %] aktiviert und adhäsive [PEG]-PEP^{TBP} gebildet, wobei die Abspaltung der eingeführten Suppressionsdomänen IF^{RhB} massenspektrometrisch nachgewiesen wurde. Auf Grundlage des hochsensitiven Messprinzips der SCP-Methode wurde die mechanische Deformierung der Peptid-PEG-SCPs interferenzmikroskopisch als

radiale Kontaktprofile auf Glasoberflächen bestimmt und mit Hilfe des JKR-Modells als Adhäsionsenergien W_{JKR} quantitativ interpretiert. Die direkte Analyse der adhäsiven Wechselwirkungen ergab für das aktivierte System **[PEG]-PEP^{Rhb}** [100 %] eine hohe Adhäsionsenergie $W_{\text{JKR}} = 986 \pm 62 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ vergleichbar mit der einer synthetisch dargestellten Bindungsreferenz **[PEG]-PEP^{TBP*}** [100 %]. An Hand ausgewählter Referenzexperimente konnten spezifische und unspezifische Oberflächeninteraktionen voneinander differenziert und somit eine effektive Adhäsionsenergie $W_{\text{eff}} = 582 \pm 20 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ für die enzymatisch freigegebene Adhäsionsdomäne **PEP^{TBP}** erzielt werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Stimuliresponsive Peptid-Polymer-Konjugate verfügen über ein einzigartiges Leistungsvermögen, die verschiedensten Einflüsse zu verarbeiten und in definierte Funktionen zu übersetzen.^[5-7] Hinsichtlich Spezifität und Vielfältigkeit sind Enzyme physikalischen und chemischen Stimuli überlegen und ermöglichen eine präzise Aktivierung polymergebundener Peptidsequenzen für materialwissenschaftliche Aufgabenstellungen.^[11-13] Die katalytisch aktiven Proteine können beispielsweise spezifische Adsorptionsprozesse induzieren, um stabile Biokonjugat-Beschichtungen für potentielle Antifouling-Anwendungen zu erzeugen.^[23, 24] Eine hierfür bisher noch nicht berücksichtigte Enzymklasse sind die Proteasen, deren bindungsspaltende Wirkmechanismen ein gezieltes Entfernen synthetischer Modifikationen und so die Rückbildung peptidbasierter Adhäsionsdomänen ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein enzymatisch prozessierbares Bindungsmotiv in das biokompatible Polymer Poly(ethylenglycol) integriert, um adhäsive Biokonjugat-Beschichtungen zu erzeugen und durch diese die unerwünschte Ablagerung von Proteinen auf einer medizinisch relevanten Oberfläche zu unterbinden.^[267]

Zur Umsetzung einer auf der Aktivierung enzymresponsiver Biokonjugate beruhenden Antifouling-Strategie wurde die Haftungseigenschaften der PEGylierten Adhäsionsdomäne RKLPDAPGMHTW (**TBP**) auf Titandioxid-Oberflächen durch *N*-terminal eingeführte Suppressionsdomänen unterdrückt und so eine Serie nicht-bindender Peptid-PEG-Konjugate erhalten. Insbesondere anionische Suppressionsdomänen in Form von Glutaminsäure-Seitenketten erwiesen sich hierbei als effizient. Die Rückbildung der nativen Oberflächenhaftung von **TBP** eingebunden in ein entsprechend konzipiertes Biokonjugat **S4-PEG** wurde durch die spezifische Erkennungssequenz ENLYFQ↓G der TEV Protease zwischen Adhäsionsdomäne **TBP** und haftungsunterbindender Einheit **IF4** ermöglicht. Im Hinblick auf materialwissenschaftliche Anwendungen wurde ein spezielles Aktivierungsprotokoll erarbeitet und eine minimale Enzymkonzentration von nur 28 Units TEV Protease als ein optimales Verhältnis hinsichtlich einer wirtschaftlichen Prozessierung hoher Biokonjugat-Mengen bestimmt. Durch die proteolytische Abtrennung der Suppressionsdomäne **IF4** wurden die adhäsiven Eigenschaften des monovalenten Biokonjugat-Binders **G-TBP-PEG^{ENZ}** erfolgreich aktiviert. Das Einbeziehen von **TBP** als zweifaches Bindungsmotiv in eine verzweigte Biokonjugat-Struktur **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** führte zu einer verstärkten Haftung auf der Metalloxid-Oberfläche im Vergleich zu der Adsorption des linearen Unimeres mit einer scheinbaren Affinitätskonstante

$K_A = 1.60 \pm 0.75 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ nach LANGMUIR. Eine Erweiterung der Suppressionsdomäne des nicht-bindenden **S4-PEG** um zwei EG-Einheiten zu **IF7** bewirkte eine entscheidende Minimierung der Haftungseigenschaften der divalenten Biokonjugat-Struktur. Die enzymatisch aktivierte Adsorption des schwach-bindenden Substrates (**S7**)₂**K-PEG** mittels 56 Units TEV Protease führte zu einer stabilen Biokonjugat-Beschichtung (**(G-TBP)**)₂**K-PEG**^{ENZ}, durch welche die unspezifischen Wechselwirkungen des Modellproteins BSA mit Titandioxid-Oberflächen erfolgreich unterbunden wurden.^[267]

Optimierungsbedarf besteht hinsichtlich der Reinheit von Peptid-PEG-Konjugaten zur Realisierung sowohl enzymatischer als auch photochemischer Aktivierungskonzepte für potentielle Antifouling-Anwendungen. Wie beschrieben, unterliegt die Darstellung von Biokonjugaten auf Grundlage der inversen Konjugationsstrategie den Grenzen der festphasengebundenen Peptidsynthese. Neben der Möglichkeit, die Hybridmakromoleküle durch Verknüpfung von Peptid- und Polymerkomponente über selektive Ligationsreaktion herzustellen, könnten die langkettigen Peptidsequenzen der Biokonjugate zukünftig affinitätschromatographisch an immobilisierten Metallionen (IMAC, engl. *immobilised-metal affinity chromatography*) aufgereinigt werden. Durch Einführung eines orthogonal abspaltbaren Affinitätstag am N-Terminus^[368] könnten so hochreine Biokonjugate erhalten werden. Dies würde eine zielführendere Umsetzung der enzymatisch aktivierbaren Adsorption von Peptid-Polymer-Konjugaten ermöglichen, wodurch das enzymbasierte Aktivierungskonzept langfristig auf andere polymergebundene Adhäsionsdomänen als proteinresistente Beschichtungen übertragen werden könnte.

Mit Hilfe elastischer PEG-Hydrogelpartikeln als Affinitätsbiosensor-Systeme für enzymatisch aktivierbare Adhäsionsdomänen sollten die spezifischen Wechselwirkungen des Peptid-Binders **TBP** mit Siliciumdioxid-Oberflächen aufgeklärt werden. Dazu wurde ein nicht-bindendes Cystein-Peptid **PEP**^{RhB} als enzymresponsiver Vorläufer konzipiert und selektiv an Maleinimid-funktionalisierte PEG-SCPs [**PEG**]-**Mal** immobilisiert. Die resultierenden [**PEG**]-**PEP**^{RhB} [100 %] verfügten über einen Funktionalisierungsgrad $FD[\text{PEP}^{\text{RhB}}] = 11 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ und konnten mittels der TEV Protease aktiviert werden. Durch Abspaltung der eingeführten Suppressionsdomänen **IF**^{RhB} wurden die [**PEG**]-**PEP**^{RhB} [100 %] in adhäsive [**PEG**]-**PEP**^{TBP} überführt. Die SCP-Methode ermöglichte eine mechanische Interpretation der adhäsionsbedingten Verformung aktivierter und nicht-aktivierter Peptid-PEG-SCPs auf Glasoberflächen. Die radialen Kontaktflächen wurden interferenzmikroskopisch abgebildet und als Adhäsionsenergien W_{JKR} quantitativ ausgelesen. Für die aktivierten [**PEG**]-**PEP**^{RhB} [100 %] wurde eine hohe Adhäsionsenergie $W_{\text{JKR}} = 986 \pm 62 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ vergleichbar mit den adhäsiven Wechselwirkungen einer synthetisch dargestellten Bindungsreferenz [**PEG**]-**PEP**^{TBP*} [100 %] ermittelt. An Hand geeignete Referenzexperimente konnten die spezifischen Oberflächeninteraktionen als eine effektive Adhäsionsenergie $W_{\text{eff}} = 582 \pm 20 \mu\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ für die enzymatisch freigegebene Adhäsionsdomäne **PEP**^{TBP} beziffert werden.

Die Immobilisierung des nicht-bindenden Cystein-Peptides **PEP**^{RhB} an Maleinimid-funktionalisierte PEG-SCPs [**PEG**]-**Mal** erfordert weiterer Optimierungen. Durch das Arbeiten mit verschiedenen Peptidüberschüssen könnten unterschiedlich hohe Beladungen erzielt und die enzyminduzierte Adhäsion in Abhängigkeit von dem Peptidfunktionalisierungsgrad charakterisiert werden. Hierbei sollte die Verwendung von Thioharnstoff als Reduktionsmittel in

Betracht gezogen werden, da das Chaotrop im Vergleich zu TCEP nicht gegenüber Maleimiden reaktiv ist^[358] und die Ligationsreaktion quantitativ umgesetzt werden könnte. Die für das Teilprojekt verwendete SCP-Methode in Kombinationen mit RICM-Messungen offerierte das Potential, die spezifischen Wechselwirkungen von peptidbasierten Adhäsionsdomänen mit verschiedenen Oberflächen quantitativ zu interpretieren. Zukünftig könnten durch kompetitive Bindungsstudien mit unspezifisch adsorbierenden Proteinen effiziente Oberflächenbinder für Antifouling-Anwendungen identifiziert werden.

Zusammenfassend konnten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate umfassende Einblicke in die gezielte Manipulation der spezifischen Oberflächenhaftung einer Adhäsionsdomäne durch synthetische Modifikationen gewähren und ein enzymbasiertes Aktivierungskonzept für stimuliresponsive Peptid-Polymer-Konjugate als bioinerte Beschichtungen zur Prävention von Proteinablagerungen auf Titanoxid-Oberflächen entwickelt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Chemikalien und Materialien

5.1.1 FESTPHASENGEBUNDENE SYNTHESE DER PEPTIDE UND PEPTID-PEG-KONJUGATE

Die für die festphasengebundene Peptidsynthese verwendeten Harze Fmoc Rink Amid AM Polystyrol (Beladung: $0.63 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) und TentaGel® S RAM (Beladung: $0.24 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) wurden von den Firmen *Iris Biotech* GmbH (Marktredwitz, Deutschland) bzw. *Rapp Polymere* GmbH (Tübingen, Deutschland) bezogen. Für die Synthese der Peptid-PEG-Konjugate wurden TentaGel® PAP Harze (*Rapp Polymere*) mit $M_n = 3.0 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Beladung: $0.27 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) und $M_n = 3.2 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Beladung: $0.24 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) verwendet. Die geschützten L-Aminosäuren Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH wurden bei *Iris Biotech*, Fmoc-Gln(Trt)-OH und Fmoc-Lys(Fmoc)-OH von *Novabiochem*® (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland) erworben. Rhodamin B (Rh^B; $\geq 95 \%$, HPLC) wurde von *Sigma-Aldrich*® Chemie GmbH (Seelze, Deutschland) bezogen.

2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (HBTU), Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorphosphat (PyBOP) und *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP; $99.9+ \%$, peptide grade) wurden bei *Iris Biotech* erworben; letzteres wurde vor Gebrauch filtriert. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA; Peptid grade, *Iris Biotech*) und Piperidin (peptide grade, *Sigma-Aldrich*®) wurden vor Gebrauch über KOH getrocknet und anschließend destilliert. Dichlormethan (CH_2Cl_2 ; peptide grade, *Iris Biotech*) wurde vor Gebrauch über CaH_2 getrocknet und anschließend destilliert. Trifluoressigsäure (TFA; 99% , *Sigma-Aldrich*®) und Diethylether (Et_2O ; technical grade, *STOCKMEIER* Chemie GmbH, Bielefeld, Deutschland) wurden vor Gebrauch destilliert. Methanol (MeOH ; LC-MS grade, *VWR*® *International* GmbH, Darmstadt, Deutschland), Pyridin anhydrous (extra pure, *Fisher Scientific* GmbH, Schwerte, Deutschland), Essigsäureanhydrid (Ac_2O ; ROTIPURAN® $\geq 99 \%$, *Carl Roth*® GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Thioanisol (*ReagentPlus*®, $\geq 99 \%$, *Sigma-Aldrich*®), Triethylsilan (TES; $98+ \%$, *Alfa Aesar*®, *Thermo Fisher Scientific* GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Trimethylbromsilan (TMSBr ; 98% , *abcr* GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 1,2-Ethandithiol (EDT; *Fluka*®, $\geq 98 \%$, *Sigma-Aldrich*®) wurden direkt verwendet.

5.1.2 ORGANISCH-PRÄPARATIVE SYNTHESSEN

[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]essigsäure (technical grade) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS; 98 %), Boc-L-Lys-OH (99 %), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC; ≥ 99.0 %) und 2,2'-(Ethylen-dioxy)diethylamin (98 %) wurden von *Sigma-Aldrich*® bezogen. 9-Fluorenylmethylsuccinimidyl-carbonat (Fmoc-OSu, *Iris Biotech*), Bernsteinsäureanhydrid (99 %, *Acros Organics*™, Geel, Belgien) und HCl (36.5 – 38 %, BAKER ANALYZED®, *Th. Geyer GmbH*, Renningen, Deutschland) wurden direkt verwendet. NaHCO₃ (≥ 99.5 %) und Na₂SO₄ (≥ 99 %, anhydrous, wurden bei *Carl Roth*® erworben. Die organischen Lösungsmittel Tetrahydrofuran (THF; technical grade), Essigsäureethylester (EtOAc; technical grade) und Methanol (MeOH; technical grade) wurden von *STOCKMEIER* bezogen und vor Gebrauch destilliert.

5.1.3 AUFREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG

α -Cyano-4-hydroxymizsäure (α CHCA; 97 %) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB; 99 %) wurden bei *Acros Organics*™ erworben. Cyanogenbromid (CNBr; reagent grade, 97 %, *Sigma-Aldrich*®), Acetonitril (MeCN; 99.90 %, LC-MS grade, *VWR*® *International*) und Ameisensäure (HCOOH; *Fluka*®, for mass spectrometry, ≈ 98 %, *Sigma-Aldrich*®) wurden direkt verwendet. Zur Herstellung von Reinstwasser (MQH₂O) diente ein LaboStar™ 1-UV Aufbereitungssystem der Firma *Evoqua Water Technologies GmbH* (Günzburg, Deutschland). Für die Aufnahme der NMR-Spektren wurde das deuterierte Lösungsmittel Chloroform (CDCl₃; 99.8 atom % D, *Sigma-Aldrich*®) verwendet.

5.1.4 ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG

Die TEV Protease (spezifische Aktivität: 5 Units· μ L⁻¹ und 10 Units· μ L⁻¹) und der 10× TEV Puffer – Konzentration nach 1:10 Verdünnung (v/v): 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME) – wurden von *Roboklon GmbH* (Berlin, Deutschland) bezogen und bei – 20 °C gelagert. Iodacetamid zur Enzyminhibierung wurde von *AppliChem GmbH* (*BioChemica*, Darmstadt, Deutschland) erworben. Die Enzymreaktionen wurden in silikonbeschichteten Mikrozentrifugenröhrchen (*Sigma-Aldrich*®, 1.7 mL, graduated, siliconized polypropylene) durchgeführt.

5.1.5 QUARZKRISTALL-MIKROWAAGE MIT DISSIPATIONS-AUFZEICHNUNG (QCM-D)

Na₂HPO₄·2H₂O (≥ 99.5 %) und NaH₂PO₄·2H₂O (≥ 99 %) wurden von *Carl Roth*® bezogen. Hellmanex™, NaOH (≥ 97 %) und Rinderserumalbumin (BSA; lyophilized powder, ≥ 96 %) wurden bei *Sigma-Aldrich*® erworben. Ethanol (EtOH, 99.8 %, AnalaR NORMAPUR®) wurde von *VWR*® *International* bezogen.

5.1.6 FUNKTIONALISIERUNG DER PEG-MIKROPARTIKEL

Guanidin Hydrochlorid (Gu·HCl; ≥ 99.5 %, für die Biochemie) und Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid (TCEP; ≥ 98 %, für die Biochemie) wurden von *Carl Roth*® bezogen.

5.2 Instrumente und Methoden

5.2.1 FESTPHASENGEBUNDENE SYNTHESE DER PEPTIDE UND PEPTID-PEG-KONJUGATE

Die vollautomatischen Synthesen der Peptide und Peptid-PEG-Konjugate wurden an einem ABI 433A Peptid Synthesizer der Marke Applied Biosystems™ (*Thermo Fisher Scientific GmbH*, Dreieich, Deutschland) gemäß der Standard-Syntheseprotokolle (SynthAssist®, *Fastmoc*™ ABI) durchgeführt und die Protokolle ggf. modifiziert. Es wurden Ansätze in Maßstäben von 0.1 mmol und 0.25 mmol für 8 mL bzw. 41 mL Reaktoren gewählt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einem UV-Vis-Detektor der Firma *PerkinElmer*® LAS GmbH (Rodgau, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 301 nm quantitativ verfolgt.

5.2.2 SEMIPRÄPARATIVE HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

Die Aufreinigung der Peptide wurde an einem *Shimadzu* System (*Shimadzu Deutschland GmbH*, Duisburg, Deutschland) unter Verwendung einer CBM-20A Steuerungseinheit, eines DGU-14A Entgasers, einer LC-20AP Pumpe, eines SIL-20AHT Probengebers und einer FCV-200AL Niederdruckgradienteneinheit vorgenommen. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines dualen UV-Vis-Festwellenlängendetektors (SPD-10A_{vp}, *Shimadzu*) mit einer präparativen Flusszelle bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Separation erfolgte automatisch durch die Chromatographiedatensoftware LabSolutions (*Shimadzu*) und die Fraktionen wurden mittels eines Fraktionssammlers (FRC-10A, *Shimadzu*) aufgefangen.

Zur Trennung diente eine Synergi™ Fusion-RP Säule (80 Å, 4 µm, 250 × 21.20 mm ID) mit einer SecurityGuard™ PREP Vorsäule (Fusion-RP, 15 × 21.20 mm ID) der Firma *Phenomenex*® (Aschaffenburg, Deutschland) bei einer Flussrate von 22 mL·min⁻¹ und Raumtemperatur. Als mobile Phase wurden eine binäre Mischung aus A (MQH₂O mit 0.1 % HCOOH, v/v) und B (MeCN mit 0.1 % HCOOH, v/v) verwendet.

5.2.3 ANALYTISCHE HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

Die quantitativen RP-HPLC-Analysen wurden mittels eines *Shimadzu* Systems bestehend aus einer SLC-10A_{vp} Steuerungseinheit, einem GT-154 Entgaser, einer LC-10AD_{vp} Pumpe, einer FCV-10AL_{vp} Niederdruckgradienteneinheit, einem CTO-10A_{vp} Säulenofen und einem SPD-M10A_{vp} PDA-Detektor (Wellenlängenbereich: 190 – 800 nm) vorgenommen. Die Probenauftragung erfolgte durch einen *Jasco* AS-950 Probengeber (*Jasco Labor- und Datentechnik GmbH*, Groß-Umstadt, Deutschland). Die Aufzeichnung der bei einer Wellenlänge von 210 nm detektierten Daten erfolgte mittels der Chromatographie-Datensoftware LabSolutions (*Shimadzu*).

Zur Trennung diente eine EC 150/2 NUCLEODUR® C₁₈ Gravity Säule (80 Å, 3 µm, 150 × 2 mm ID; *Machery-Nagel GmbH*, Düren, Deutschland) mit einer EC 4/2 NUCLEODUR® C₁₈ Gravity Vorsäule (80 Å, 3 µm, 4 × 2 mm ID; *Machery-Nagel*) bei einer Flussrate von 0.3 mL·min⁻¹ und einer Temperatur von 40 °C. Als mobile Phase wurden eine binäre Mischung aus A (MQH₂O mit 0.1 % HCOOH, v/v) und B (MeCN mit 0.1 % HCOOH, v/v) verwendet.

5.2.4 ANALYTISCHE ULTRAHOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT MASSEN-SPEKTROMETRIE (UHPLC-MS)

Die Reinheit der synthetisierten Peptide und der Peptid-PEG-Konjugate nach CNBr-Spaltung wurde mittels analytischer UHPLC-MS bei einer Wellenlänge von 210 nm überprüft. Dabei wurde ein ACQUITY-UPLC® H-Class CM Core System der Firma Waters GmbH (Eschborn, Deutschland) mit einem ACQUITY-UPLC® Photodiodenarray (PDA)-Detektor (Wellenlängenbereich: 190 – 500 nm) und einem ACQUITY-UPLC® QDa Massendetektor im positiven Modus verwendet. Sowohl die Aufzeichnung der gemessenen Daten als auch die Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren wurde mittels der Chromatographie-Datensoftware Empower™ 3 (Waters) vorgenommen.

Zur Trennung dienten ACQUITY-UPLC® BEH C18 Säulen (110 Å, 1,7 µm, 50 × 2.1 mm ID und 110 Å, 1,7 µm, 100 × 2.1 mm ID) mit ACQUITY-UPLC® BEH C18 VanGuard™ Vorsäulen (110 Å, 1,7 µm, 5 × 2.1 mm ID) der Firma Waters bei einer Flussrate von 0.5 mL·min⁻¹ und einer Temperatur von 40 °C. Als mobile Phase wurden eine binäre Mischung aus A (MQH₂O mit 0.1 % HCOOH, v/v) und B (MeCN mit 0.1 % HCOOH, v/v) verwendet.

5.2.5 MATRIX-UNTERSTÜTZTE LASER-DESORPTION/IONISATION MIT FLUGZEITMASSEN-SPEKTROMETER-DETEKTION (MALDI-TOF-MS)

Die Massenspektren wurden an einem Bruker autoflex II smartbeam™ (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Deutschland) mit MALDI und einem Flugzeitmassenspektrometer (ToF) aufgenommen. Die zu analysierenden Proben sowie die Matrices DHB und α CHCA mit Konzentrationen von 10 mg·mL⁻¹ bzw. 7 mg·mL⁻¹ wurden in MQH₂O/MeCN (1:1, v/v) versetzt mit 0.1% TFA aufgenommen. Auf der Probenplatte wurde 1 µL der entsprechenden Matrix vorgelegt und mit jeweils 1 µL Probe vermischt. Die Messungen erfolgten im linear-positiven Modus, nachdem die Proben bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

5.2.6 FOURIER-TRANSFORM-INFRAROTSPEKTROSKOPIE (FT-IR)

Die FT-IR-Spektren wurden mit einem Bruker Vertex 70v FT-IR-Spektrometer (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Deutschland) im Bereich von 4000 – 400 cm⁻¹ aufgezeichnet. Die Proben wurden als Feststoff bei Raumtemperatur im Feinvakuum vermessen. Die Lage der IR-Banden wurde in cm⁻¹ (*v*) und die Intensität der Signale als sehr stark (*vs*), stark (*s*), mittel (*m*), schwach (*w*) und sehr schwach (*vw*) angegeben.

5.2.7 KERNMAGNETISCHE RESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)

Die NMR-spektroskopischen Messungen wurden mit einem Bruker AvanceIII-500 Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) in 5-mm-NMR-Röhrchen bei einer Temperatur von 20 °C vorgenommen. Zur Aufnahme der ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren wurden Messfrequenzen bei 500.13 MHz bzw. 125.76 MHz verwendet. Die ¹³C-NMR-Spektren wurden ¹H-entkoppelt oder nach der APT-Prozedur aufgezeichnet. Alle chemischen Verschiebungen [δ]

wurden relativ zu Tetramethylsilan in parts per million [ppm] angegeben, die Kopplungskonstanten J in Hertz [Hz], sowie die integrierte Protonenzahl. Die Signalmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett und m = Multiplett. Die Kalibrierung in ^1H -NMR-Spektren erfolgte intern gegen das Restprotonen-Signal bzw. in ^{13}C -NMR-Spektren gegen das ^{13}C -Signal des deuterierten Lösungsmittels.

Die Messungen wurden im Service durch ANGELA THIESIES der Arbeitsgruppe NMR-Spektroskopie von Prof. Dr. CLEMENS MÜGGE (Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin) vorgenommen.

5.2.8 FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE

Die Fluoreszenz-Emissions-Spektren wurden mit einem *Synergy MX* Mikroplattenleser (*BioTek Instruments GmbH*, Bad Friedrichshall, Deutschland) in schwarzen 96-Loch-Fluoreszenz-Mikrotiterplatten (*Thermo Fisher Scientific GmbH*, Schwerte, Deutschland) gemessen und mittels der *BioTek Gen5 Data Analysis Software* aufgezeichnet.

5.2.9 ZENTRIFUGATION

Die Zentrifugationen von gefällten Peptiden und Peptid-PEG-Konjugaten wurden in einer Tischzentrifuge Universal 320 der Firma *Andreas Hettich GmbH & Co.KG* (Tuttlingen, Deutschland) bei einer Drehzahl von 9000 min^{-1} für 15 – 20 min durchgeführt. Als Gefäße dienten 50 mL Zentrifugenröhrchen der Firma *Sarstedt AG & Co.* (Nümbrecht, Deutschland).

Für die Zentrifugationen der Reaktionsansätze der enzymatischen Aktivierung sowie für die Waschschrte der PEG-Partikel wurde eine Mikroliterzentrifuge (Mini-Zentrifuge mini G, *Carl Roth®*) bei einer Drehzahl von 6000 min^{-1} verwendet.

5.2.10 LYOPHILISATION

Für die Lyophilisation wurden die Proben in MQH_2O aufgenommen bzw. nach Bedarf MeCN zur Verbesserung der Löslichkeit zugesetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Proben in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 der Firma *Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH* (Osterode, Deutschland) im Feinvakuum eingengt.

5.2.11 TEMPERIERTE REAKTIONSANSÄTZE IM MIKROMAßSTAB

Für eine konstante Temperierung der Aktivierungsansätze in 1.7 mL-Mikrozentrifugenröhrchen wurde ein Kühl-Thermomixer MKR 13 der Firma *DITABIS AG* (Pforzheim, Deutschland) bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} verwendet.

5.3 Protokolle und allgemeine Arbeitsvorschriften

5.3.1 FESTPHASENGEBUNDENE SYNTHESE DER PEPTIDE UND PEPTID-PEG-KONJUGATE

5.3.1.1 *Protokoll 1: Automatisierte Synthese der Peptide*

Protokoll 1a:

Harz: Fmoc-geschütztes TentaGel® S RAM (Beladung: 0.24 mmol·g⁻¹)

Ansatzgröße: 0.1 mmol

Fmoc-Entschützung: In einem Reaktor wurde das in NMP vorgequollene Harz für 2 × 2 min mit 15 % Piperidin in NMP (v/v) behandelt und anschließend mit NMP gewaschen.

Kupplung der Standard-Aminosäuren: 10.0 Äq. Fmoc-Aminosäure (1.0 mmol) wurden in 2.1 g NMP in einer Kartusche gelöst, 2.0 g einer 0.45 M Lösung von HBTU (0.9 mmol, 9.0 Äq.) in NMP hinzugefügt und die Lösung in den Aktivator überführt. Durch Hinzugeben von 3 mL einer 2.0 M Lösung von DIPEA (6.0 mmol, 60.0 Äq.) in NMP wurde die Aminosäure aktiviert und anschließend in den Reaktor überführt. Nach einer Kupplungszeit von 45 min wurde das Harz sechsmal mit NMP gewaschen. Ab der 10. Kupplung wurde die Prozedur für die jeweilige Aminosäure wiederholt (Doppelkupplung).

Acetylierung: Nach dem abschließenden Waschschrift mit CH₂Cl₂ wurde das Peptid-Harz in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und sechsmal mit NMP gewaschen. Die Fmoc-Entschützung erfolgte mit 20 % Piperidin in NMP (v/v) für 2 × 5 min. Zur Acetylierung des N-Terminus diente 10 % Ac₂O in Pyridin (v/v) für 10 min. Danach wurde das Peptid-Harz sechsmal mit NMP und sechsmal mit CH₂Cl₂ gewaschen und im Feinvakuum (ca. 10 mbar) bei Raumtemperatur getrocknet.

Protokoll 1b:

Das verwendete Harz und die Ansatzgröße sowie die Syntheseschritte der Fmoc-Entschützung und Kupplung der Standard-Aminosäuren wurden aus dem **Protokoll 1a** übernommen.

Kupplung von Fmoc-OEG-COOH: Zur Integration des nicht natürlichen Aminosäure-Bausteins in den automatisierten Syntheseprozess wurde eine 1.0 M Lösung in NMP angesetzt und je 1.1 mL pro Kupplung in eine Kartusche (1.0 mmol, 10.0 Äq.) gegeben, wobei Doppelkupplungsschritte durchgeführt wurden.

Kupplung von Rh^B: Nach dem abschließenden Waschschrift mit CH₂Cl₂ wurde das entsprechende Fmoc-geschützte Peptid-Harz in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und sechsmal mit NMP gewaschen. 5.0 Äq. Rh^B (0.5 mmol) wurden mit 5.0 Äq. PyBOP (0.5 mmol) für 30 s in NMP voraktiviert (in Lösung: 0.1 M Fmoc-Aminosäure) und zusammen mit 10.0 Äq. DIPEA (1.0 mmol) auf das Harz gegeben. Nach einer Kupplungszeit von 45 min wurde das Harz zehnmal mit NMP und zehnmal mit CH₂Cl₂ gewaschen, die Waschschriffe jeweils zweimal wiederholt und das Harz anschließend im Feinvakuum (ca. 10 mbar) bei Raumtemperatur getrocknet.

5.3.1.2 *Protokoll 2: Automatisierte und manuelle Synthese der linearen Peptid-PEG-Konjugate*

Harz: nicht Fmoc-geschütztes TentaGel® PAP (Beladung: $0.27 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, $M_{n, \text{PEG}} = 3.0 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, PDI = 1.04)

Ansatzgröße: 0.25 mmol

Kupplung: 4.0 Äq. Fmoc-Aminosäure (1.0 mmol) wurden in 2.1 g NMP in einer Kartusche gelöst, 2.0 g einer 0.45 M Lösung von HBTU (0.9 mmol, 3.6 Äq.) in NMP hinzugefügt und die Lösung in den Aktivator überführt. Durch Hinzugeben von 3 mL einer 2.0 M Lösung von DIPEA (6.0 mmol, 24.0 Äq.) in NMP wurde die Aminosäure aktiviert und anschließend in den Reaktor mit vorgequollenem Harz überführt. Nach einer Kupplungszeit von 45 min wurde das Harz sechsmal mit NMP gewaschen. Ab der 10. Kupplung wurde die Prozedur für die jeweilige Aminosäure wiederholt (Doppelkupplung).

Fmoc-Entschützung: Das Harz wurde für $2 \times 2 \text{ min}$ mit 15 % Piperidin in NMP (v/v) behandelt und anschließend mit NMP gewaschen.

Die automatisierte Synthese wurde bis zur 20. Aminosäure fortgeführt. Nach dem abschließenden Waschschrift mit CH_2Cl_2 wurde das entsprechende Fmoc-geschützte Peptid-PEG-Harz in einen Spritzenreaktor geeigneter Größe überführt und im Vakuum (ca. 10 mbar) bei Raumtemperatur getrocknet. Die Synthesen wurden in verschiedenen Ansatzgrößen zwischen 5 - 25 μmol manuell fortgesetzt.

Fmoc-Entschützung: Das in NMP vorgequollene Harz wurde für $2 \times 5 \text{ min}$ mit 20 % Piperidin in NMP (v/v) behandelt und anschließend sechsmal mit NMP gewaschen.

Kupplung: 4.0 Äq. Fmoc-Aminosäure bzw. **Fmoc-K^εOEG** wurden mit 3.9 Äq. HBTU für 30 s in NMP voraktiviert (0.1 M Lösung Fmoc-Aminosäure) und zusammen mit 8.0 Äq. DIPEA auf das Harz gegeben. Nach 45 min wurde das Peptid-PEG-Harz sechsmal mit NMP gewaschen und die Prozedur wiederholt.

Acetylierung: Nach der finalen Fmoc-Entschützung diente eine Behandlung des Harzes mit 10 % Ac₂O in Pyridin (v/v) für 10 min zur Acetylierung des N-Terminus. Danach wurde das Peptid-PEG-Harz sechsmal mit NMP und sechsmal mit CH_2Cl_2 gewaschen und im Feinvakuum (ca. 10 mbar) bei Raumtemperatur getrocknet.

5.3.1.3 *Protokoll 3: Automatisierte und manuelle Synthese der verzweigten Peptid-PEG-Konjugate*

Harz: nicht Fmoc-geschütztes TentaGel® PAP (Beladung: $0.24 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, $M_{n, \text{PEG}} = 3.2 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, PDI = 1.04)

Ansatzgröße: 0.125 mmol

Kupplung: 8.0 Äq. Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH (1.0 mmol) wurde in 2.1 g NMP in einer Kartusche gelöst, 2.0 g einer 0.45 M Lösung von HBTU (0.9 mmol, 7.2 Äq.) in NMP hinzugefügt und die Lösung in den Aktivator überführt. Durch Hinzugeben von 3 mL einer 2.0 M Lösung von DIPEA (6.0 mmol, 48.0 Äq.) in NMP wurde die Aminosäure aktiviert und anschließend in den

Reaktor mit Harz überführt. Nach einer Kupplungszeit von 45 min wurde das Harz sechsmal mit NMP gewaschen. Für die nachfolgenden Kupplungen entsprach die Einwaage von 1.0 mmol Fmoc-Aminosäure 4.0 Äq. (0.5 mmol) je Peptidkette. Ab der 10. Kupplung wurde die Prozedur für die jeweilige Aminosäure wiederholt (Doppelkupplung).

Fmoc-Entschützung: Das Harz wurde für 2×2 min mit 15 % Piperidin in NMP (v/v) behandelt und anschließend mit NMP gewaschen.

Die automatisierte Synthese wurde bis zur 15. Aminosäure fortgeführt. Nach dem abschließenden Waschschrift mit CH_2Cl_2 wurde das entsprechende Fmoc-geschützte Peptid-PEG-Harz in einen Spritzenreaktor geeigneter Größe überführt und im Feinvakuum (ca. 10 mbar) bei Raumtemperatur getrocknet. Die Biokonjugat-Synthesen wurden in verschiedenen Ansatzgrößen zwischen 5 – 25 μmol manuell fortgesetzt.

Fmoc-Entschützung: Das in NMP vorgequollene Harz wurde für 2×5 min mit 20 % Piperidin in NMP (v/v) behandelt und anschließend sechsmal mit NMP gewaschen.

Kupplung: 8.0 Äq. Fmoc-Aminosäure wurden mit 7.8 Äq. HBTU für 30 s in NMP voraktiviert (in Lösung: 0.1 M Fmoc-Aminosäure) und zusammen mit 16.0 Äq. DIPEA auf das Harz gegeben. Nach 45 min wurde das Peptid-PEG-Harz sechsmal mit NMP gewaschen und die Prozedur wiederholt.

Acetylierung: Nach der finalen Fmoc-Entschützung diente eine Behandlung des Harzes mit 10 % Ac_2O in Pyridin (v/v) für 10 min zur Acetylierung des N-Terminus. Danach wurde das Peptid-PEG-Harz sechsmal mit NMP und sechsmal mit CH_2Cl_2 gewaschen und im Feinvakuum (ca. 10 mbar) bei Raumtemperatur getrocknet.

5.3.1.4 **Protokoll 4:** Abspaltung und Entschützung der Peptide ohne Cystein

Für die Abspaltung von der festen Phase und simultane Entschützung wurde eine Mischung aus TFA/MQH₂O/TES (96:2:2, v/v/v) verwendet und das Harz nach 2 – 3 h mit TFA extrahiert. Das entschützte Peptid wurde anschließend in kaltem Et₂O gefällt (– 20 °C, 2×50 mL) und bei einer Drehzahl von 9000 min^{–1} für 15 – 20 min zentrifugiert, danach in TFA aufgenommen, erneut in kaltem Et₂O gefällt (– 20 °C, 2×50 mL) und zentrifugiert. Vor der Lyophilisation wurde die bevorzugt in MQH₂O gelöste Substanz (ggf. wenig MeCN hinzugegeben) durch einen Rotilabo®-Spritzenfilter (PVDF, 0.22 μm , Ø 33 mm, Carl Roth®, KY62.1) filtriert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC.

5.3.1.5 **Protokoll 5:** Abspaltung und Entschützung der Peptide mit Cystein

Für die Abspaltung von der festen Phase und simultane Entschützung wurde eine Mischung aus TFA/MQH₂O/TES/EDT (94:2:2:2, v/v/v/v) verwendet und das Harz nach 2 – 3 h mit TFA extrahiert. Das entschützte Peptid wurde anschließend in kaltem Et₂O gefällt (– 20 °C, 2×50 mL) und bei einer Drehzahl von 9000 min^{–1} für 15 – 20 min zentrifugiert, danach in TFA aufgenommen, erneut in kaltem Et₂O gefällt (– 20 °C, 2×50 mL) und zentrifugiert. Vor der

Lyophilisation wurde die bevorzugt in MQH₂O gelöste Substanz (ggf. wenig MeCN hinzugegeben) durch einen Rotilabo®-Spritzenfilter (PVDF, 0.22 µm, Ø 33 mm) filtriert. Anschließend wurde das Peptid mittels TCEP reduziert und semipräparativ aufgereinigt.

5.3.1.6 **Protokoll 6:** Abspaltung und Entschützung der Peptid-PEG-Konjugate

Für die Abspaltung von der festen Phase und simultane Entschützung wurde eine Mischung aus TFA/Thioanisol/TMSBr (94:5:1, v/v/v) verwendet und das Harz nach 1 h mit TFA extrahiert. Das entschützte Biokonjugat wurde anschließend in kaltem Et₂O gefällt (– 20 °C, 2 × 50 mL) und bei einer Drehzahl von 9000 min^{–1} für 15 – 20 min zentrifugiert, danach in TFA aufgenommen, erneut in kaltem Et₂O gefällt (– 20 °C, 2 × 50 mL) und zentrifugiert. Vor der Lyophilisation wurde die wasserlösliche Substanz durch einen Rotilabo®-Spritzenfilter (PVDF, 0.22 µm, Ø 33 mm) filtriert.

5.3.2 ANALYSE VON PEPTID-PEG-KONJUGATEN MITTELS CNBR-SPALTUNG^[273]

Die CNBr-Spaltung diente der Reinheitsbestimmung der Substrate der enzymatischen Aktivierung **S4-PEG** und **(S7)₂K-PEG** und der Charakterisierung der verzweigten Dimere **(S4)₂K-PEG** und **(S7)₂K-PEG**. Letztere zeigten bei der Analyse mittels MALDI-ToF-MS eine schwache Desorption in die Gasphase, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis und die Signalauflösung vermindert wurden. Höhermolekulare Biokonjugat-Strukturen mit verzweigten oder cyclischen Peptidketten tendieren im Vergleich zu linearen Analoga häufiger dazu Aggregate zu bilden, so dass die Verteilung der Substanz innerhalb Matrix inhomogen ist und die Ionisierung der Komponente beeinträchtigt wird.^[369] Daher wurden die Peptid-PEG-Konjugate mittels CNBr behandelt und die bei der Spaltung der Methionin-Seitenkette entstandenen Peptidfragmente zur Charakterisierung der Verbindungen verwendet.

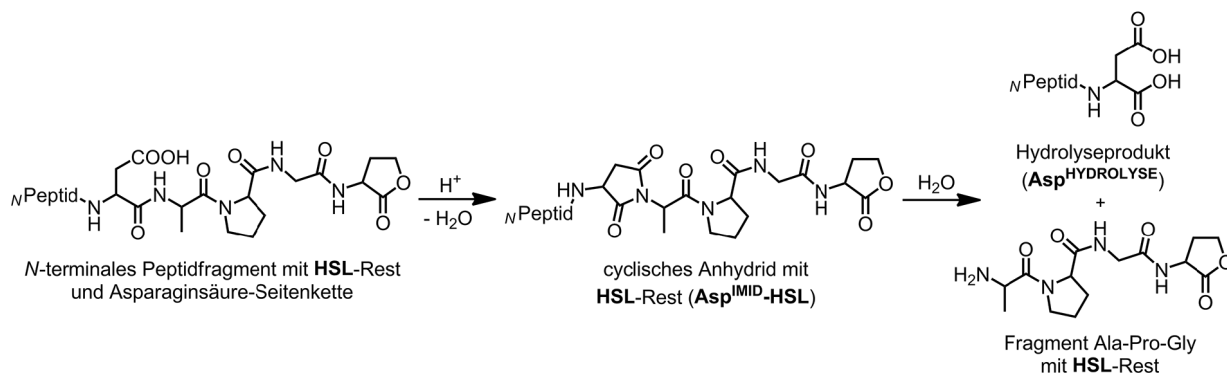
5.3.2.1 **Protokoll 7:** Prozedur zur CNBr-Spaltung^[273]

Das beschriebene Protokoll wurde von der entsprechenden Literaturvorschrift adaptiert.^[273] Die CNBr-Spaltung der Peptid-PEG-Konjugate wurde in 1.5 mL Mikrozentrifugenröhrchen mit einer Konzentration 50 µM unter Verwendung von 10 mM CNBr (200 Äq. entsprechend der Anzahl der Methionin-Seitenketten) in 1 mL HCOOH/MQH₂O (7:3, v/v) durchgeführt. Die Lösung wurde 12 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend lyophilisiert. Für Identifizierung der Spaltprodukte mittels MALDI-ToF-MS wurde der Rückstand mit MQH₂O/MeCN (1:1, v/v) versetzt mit 0.1% TFA aufgenommen. Zur Bestimmung der Reinheit mittels UHPLC-MS wurde der Rückstand in MQH₂O versetzt mit 0.1 % HCOOH (v/v) gelöst.

5.3.2.2 *Mögliche Nebenreaktionen während der CNBr-Spaltung*

Die Amidbindungen von Asparaginsäure-Seitenketten können während der CNBr-Behandlung in Gegenwart von HCOOH gespalten werden.^[370-372] Durch die sauren Bedingungen über

einen längeren Zeitraum erfolgt dabei zunächst die Bildung eines cyclischen Imides am Peptid-rückgrat, welches anschließend hydrolysiert wird. **Schema E1** zeigt exemplarisch die Spaltung eines *N*-terminalen Peptidfragmentes mit einem Homoserin-Lacton-Rest (HSL) am C-Terminus, wobei zunächst durch Dehydratisierung das tetrahedrale Intermediat **Asp^{IMID}-HSL** in C-terminaler Richtung entstehen kann, gefolgt von der Hydrolyse zu dem succinimidylterminierten **Asp^{HYDROLYSE}** und dem Fragment Ala-Pro-Gly mit einem HSL-Rest.



Schema E1. Spaltung der Amidbindung C-terminal der Asparaginsäure-Seitenkette eines *N*-terminalen Peptidfragmentes mit einem Homoserin-Lacton-Rest (HSL) am C-Terminus unter den sauren Bedingungen der CNBr-Behandlung. Durch Dehydratisierung wird zunächst das cyclische Imid **Asp^{IMID}-HSL** gebildet, welches anschließend zu dem succinimidylterminierten **Asp^{HYDROLYSE}** und dem Fragment Ala-Pro-Gly mit einem HSL-Rest hydrolysiert.

Der in **Schema E1** beschriebenen Nebenreaktion können ebenfalls die *N*-terminalen Peptidfragmente mit einem Homoserin-Rest (HS) unterliegen. Zusätzlich können die während der CNBr-Behandlung entstehenden HS-Fragmente in Gegenwart von HCOOH formyliert werden (**HS^{FORM}**).^[274]

5.3.3 QUARZKRISTALL-MIKROWAAGE MIT DISSIPATIONS-AUFZEICHNUNG (QCM-D)

5.3.3.1 Protokoll 8: Allgemeine Messvorschrift QCM-D

Die QCM-D-Messungen erfolgten mit einem *Q-Sense* E1 Durchflussmodul (*Biolin Scientific* Holding AB, Stockholm, Schweden) ausgestattet mit einer IPC 4 Ismatec® Multikanalpumpe (*Cole-Parmer* GmbH, Wertheim, Deutschland) als flussunterbrechende Analyse. Als Oberflächen dienten titanbeschichtete (QSX 310 Ti, 120 nm; *Q-Sense*, *Biolin Scientific*; vgl. **Abbildung E1**) und mit Siliciumdioxid beschichtete piezoelektrische Sensorkristalle (QSX 303 SiO₂, 50 nm; *Q-Sense*, *Biolin Scientific*). Vor den Messungen wurden die Sensorkristalle nach der in **Protokoll 9** beschriebenen Prozedur gereinigt. Anschließend wurde ein Sensor in der Durchflusskammer platziert und mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) bei einer Temperatur von 22 °C inkubiert. Die Messungen wurden bei Flussraten von 50 µL·min⁻¹ für titanbeschichtete bzw. 30 µL·min⁻¹ für mit Siliciumdioxid beschichtete Sensorkristalle durchgeführt. Die Oszillationsfrequenzen wurden bis zum Erhalt einer konstanten Basislinie (ca. 1 – 3 h) beobachtet. Anschließend wurden die zu vermessenden Proben in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen, im Ultraschallbad entgast und durch die Flusskammer gepumpt. Die Frequenzen wurden erneut aufgezeichnet, bis ein konstantes Signal erhalten wurde. Die nachfolgenden

Waschschritte erfolgten mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) oder in Puffer gelöstem BSA mit einer Konzentration von $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Frequenzobertöne $\Delta f_n/n$ sowie die Dissipationsobertöne ΔD_n von $n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$ und 13 wurden simultan mit der Anwendersoftware QSoft (*Q-Sense, Biolin Scientific*) aufgezeichnet und die jeweils dritten Obertöne $\Delta f_{n=3/3}$ und $\Delta D_{n=3}$ zur Auswertung herangezogen. Vor Beginn der Messungen wurden Schwebstoffe aus dem 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) bzw. den BSA-Lösungen mittels Rotilabo® Spritzenfilter (PVDF, $0.22 \mu\text{m}$, $\varnothing 33 \text{ mm}$) entfernt.

Q-Sense Sensor QSX 310 Ti

Product Specifications

LAYER STRUCTURE

Ti 120 nm
Au
Cr
Quartz Disc
Not to scale

SENSOR LAYOUT

TOP SIDE
BACK SIDE

AFM PICTURE

SENSOR SPECIFICATIONS

Q-Sense Sensor QSX 310 Ti
Description Quartz disc AT-cut fundamental frequency 5 MHz
Top coating material Titanium (Ti) ^a Thickness 120 nm
Surface roughness Rms (nm): 1.7 ± 0.2 ^a
Coating method (PVD) Physical Vapor Deposition
Operating temperature range 4 - 250 °C ^c
Cleaning method ^d <ol style="list-style-type: none"> 1. Immerse the sensor surfaces in 1 % Hellmanex II (www.hellmanex.com) for 30 minutes at room temperature 2. Rinse with milliQ water 3. Dry with nitrogen gas 4. Sonicate in 95 % ethanol for 10 minutes 5. Rinse with milliQ water 6. Dry with nitrogen gas 7. UV/ozone treat for 10 minutes
Chemical compatibility No strong acids or bases

^a The chemical composition was confirmed by XPS.
^b In air atmosphere. Temperatures over 250 °C are not tested. Above 573 °C, the quartz material undergoes a phase change and loses the piezoelectric property.
^c The suggested method is not harmful to the sensor coatings themselves, however note that there is no guarantee that materials adsorbed onto the coatings are removed - this depends on the coupling chemistry of the adsorbed materials.
Please contact your local sales representative if you need more information.

www.q-sense.com

Headquarters Scandinavia Biolin Scientific AB, Box 70279, SE-102 24 Stockholm, Sweden, +46 31 769 7600, www.biolinscientific.com
Headquarters North and South America Biolin Scientific, Inc., 18717 73rd Avenue, Eden Prairie, MN 55347, USA, +1 977 773 8720, us@biolinscientific.com
+44 (0)181 438 9700, uk@biolinscientific.com

Abbildung E1. Produktspezifikationen der titanbeschichteten piezoelektrischen Sensorkristalle (Titan: 120 nm, QSX 310 Ti; Biolin Scientific).

5.3.3.2 Protokoll 9: Reinigung der piezoelektrischen Sensorkristalle^[373]

Die Reinigungsprozedur wurde entsprechend der Literaturvorschrift adaptiert und erfolgte direkt vor den Messungen.^[373] Dazu wurden die piezoelektrischen Sensorkristalle für 30 min in 2% Hellmanex™ in MQH₂O (v/v) inkubiert, anschließend für 10 min in EtOH mit Ultraschall behandelt, danach mit MQH₂O gewaschen und mit Druckluft (Dust Off 67, Kontakt Chemie®, CRC Industries Deutschland GmbH, Iffezheim, Deutschland) getrocknet. Danach erfolgte für 3 – 5 min eine Behandlung mit Luftplasma in einem ZEPTO Plasmareiniger (Diener electronic GmbH, Ebhausen, Deutschland) bei einer Leistung von 75 W im Feinvakuum. Zum Schluss wurde die Prozedur mit 2 % Hellmanex™ in MQH₂O (v/v), Ultraschall in EtOH, Waschen mit MQH₂O und Trocknen mit Druckluft wiederholt.

5.3.3.3 **Protokoll 10:** Adsorbierte Massen nach SAUERBREY für rigide Beschichtungen

Mittels der Modellierungssoftware QTools (Q-Sense, Biolin Scientific) wurden die adsorbierten Massen $\Delta m_{\text{SAUERBREY}}$ [$\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$] der Beschichtungen der Peptid-PEG-Konjugate und der TEV Protease nach SAUERBREY bestimmt. Die Auswertung erfolgte an Hand der Frequenzobertöne $\Delta f_n/n$ von $n = 3, 5, 7$, und 9 nahe des Sättigungsbereiches. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und die entsprechenden Standardabweichungen berechnet.

5.3.3.4 **Protokoll 11:** Schichtdicken und adsorbierte Massen nach VOIGT für viskoelastische Beschichtungen

Die Bestimmung der Schichtdicken d_{VOIGT} [nm] und adsorbierten Massen Δm_{VOIGT} [$\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$] nach VOIGT erfolgte an Hand der ermittelten Daten von Frequenz- und Dissipationsänderungen durch das Anlegen einer Näherungsfunktion. Dabei wurden die Rahmenbedingungen für die zu approximierenden Parameter unter Verwendung geeigneter Grenzen definiert und konstante Werte für die übrigen physikalischen Parameter basierend auf validierten Messdaten festgelegt. Die einzelnen Schritte zur Berechnung auf Basis der Programmfunktion “viscoelastic models for f and D ” in QTools sind nachfolgend beschrieben:

Grundlegende Einstellungen (*model settings*): Die ersten Obertöne der aufgezeichneten Frequenz- und Dissipationsobertöne wurden aufgrund deren hoher Sensitivität ausgeschlossen und die Frequenzobertöne $\Delta f_n/n$ sowie die Dissipationsobertöne ΔD_n von $n = 3, 5, 7, 9$ und 11 für die Modellierung verwendet. Maximal zwei der Obertöne wurden bei der Berechnung ausgeschlossen, sobald diese gegenüber dem übrigen Datensatz eine zu hohe Abweichung aufwiesen.

Zu nähernde Parameter (*parameters to fit*): Der initial verwendende Grenzbereich für die Viskosität η_{FILM} und das Schermodul μ_{FILM} der Beschichtungen sowie für die Schichtdicke d_{VOIGT} sind in **Tabelle E1** aufgeführt. Die Anzahl der logarithmischen Stufen wurde auf 20 festgelegt.

Tabelle E1. Initiale Grenzen der zu nähernden Parameter für die Anwendung des VOIGT-Modells in QTools.

zu nähernde Parameter	Grenzbereich
Viskosität der Beschichtung η_{FILM}	$0.0005 - 0.01 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
Schermodul der Beschichtung μ_{FILM}	$1\cdot 10^5 - 1\cdot 10^8 \text{ Pa}$
Schichtdicke d_{VOIGT}	$1\cdot 10^{-10} - 1\cdot 10^{-8} \text{ m}$

Festgelegte Parameter (*fixed parameters*): Die Dichte der Beschichtung ρ_{FILM} sowie die Dichte ρ_{LM} und Viskosität η_{LM} des Lösungsmittels (LM) sollten möglichst dem realen System entsprechen und sind in **Tabelle E2** aufgeführt. Da die Beschichtungen eingelagerte Wassermoleküle enthalten, wurden für die Parameter des Lösungsmittels die validierten Werte für Wasser angenommen. Die Dichte ρ_{FILM} der Beschichtung wurde in Übereinstimmung mit Literaturangaben für Filme von Poly(ethylenglycol)en und Biokonjugaten auf $1.200 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ festgelegt.^[374-376]

Tabelle E2. Werte der festgelegten Parameter für die Anwendung des VOIGT-Modells in QTools.

festgelegte Parameter	Werte
Dichte des Lösungsmittels ρ_{LM}	1000 kg·m ⁻³
Viskosität des Lösungsmittels η_{LM}	0.001 kg·m ⁻¹ ·s ⁻¹
Dichte der Beschichtung ρ_{FILM}	1200 kg·m ⁻³

Gemessene Daten (*measured data*): Die automatische Standardabweichung wurde angewendet (*automatic standard deviation estimation*).

Einstellungen für die Modellierung (*fit settings*): Die Zeitachse wurde in Übereinstimmung mit dem Bereich der Adsorptionsisothermen festgelegt und die Option “*grid only first row to fit*” ausgewählt.

Nach einer ersten Bestimmung der Schichtdicke (*fit analysis*) wurde die Näherungsfunktion durch Anpassung der Grenzen der zu nähernden Parameter optimiert, wobei gleichzeitig die Anzahl der logarithmischen Stufen auf 50 erhöht wurde. Die Bewertung der Näherungsfunktion erfolgte an Hand des Bestimmtheitsmaßes χ^2 , welches sukzessiv minimiert wurde. Die verbesserte Näherungsfunktion ergab die eigentliche Schichtdicke d_{VOIGT} [nm] des viskoelastischen Films.

Für die Fehlerbestimmung wurde die berechnete Schichtdicke als ein konstanter Parameter gesetzt und die Grenzen der Modellierung auf ein schmales Zeitintervall von 1 – 2 min nahe dem Sättigungsbereich festgelegt. Die Viskosität und das Schermodul der Beschichtung wurden erneut genähert und das entsprechende Bestimmtheitsmaß χ^2 ermittelt. Anschließend wurde die Schichtdicke zu niedrigen und höheren Werten variiert, um eine Verdopplung von χ^2 zu erreichen. Die erhaltenen Differenzen entsprachen dem Fehler der Beschichtung.

Unter Verwendung der festgelegten Dichte der Beschichtung $\rho_{\text{FILM}} = 1.200 \text{ g·cm}^{-3}$ konnte die Schichtdicke d_{VOIGT} [nm] in die adsorbierte Masse Δm_{VOIGT} [ng·cm⁻²] für den jeweiligen Film umgerechnet werden:

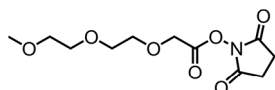
$$\Delta m_{\text{VOIGT}} = d_{\text{VOIGT}} \cdot \rho_{\text{FILM}} \quad \text{(Gleichung E1)}$$

5.4 Präparative Synthesen der nicht natürlichen Aminosäuren

5.4.1 SYNTHESE VON N_{α} -Fmoc- N_{ϵ} -(2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetyl)-L-Lysin (Fmoc- $K^{\epsilon\text{OEG}}$)

Die Synthese des Boc-geschützten Vorläufers **Boc- $K^{\epsilon\text{OEG}}$** wurde analog der Literaturvorschrift vorgenommen.^[377] Zur Darstellung von **Fmoc- $K^{\epsilon\text{OEG}}$** wurde die Literaturvorschrift zur Fmoc-Schätzung entsprechend adaptiert.^[378]

5.4.1.1 *N*-Hydroxysuccinimidyl-2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetat (**OEG-OSu**)^[377]

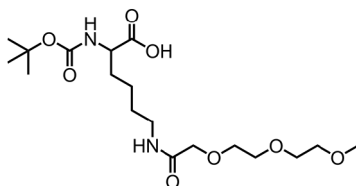


2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]essigsäure (5.56 g, 0.31 mol, 1.00 Äq.) und NHS (4.10 g, 0.32 mol, 1.03 Äq.) wurden in 160 mL THF aufgenommen, mit einem Eisbad auf eine Temperatur von ca. 0 °C gekühlt und unter Rühren portionsweise DCC (6.66 g, 0.32 mol, 1.03 Äq.) hinzugefügt. Die Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Nacht bei einer Temperatur von ca. 4 °C gelagert. Der entstandene Niederschlag von *N,N'*-Dicyclohexyl-Harnstoff wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt, bis ein farbloses Öl zurückblieb. Das Rohprodukt wurde in wenig THF aufgenommen, der entstandene Niederschlag abfiltriert und die Prozedur so lange wiederholt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Feinvakuum wurde **OEG-OSu** (8.15 g, 0.30 mol, 96 %) in Form eines farblosen Öls erhalten.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] 4.50 (s, 2H, $\text{OCH}_2\text{CO}[\text{O}]$), 3.80-3.78 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.70-3.68, 3.64-3.62 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.55-3.53 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 3.34 (s, 3H, CH_2OCH_3), 2.76 (s, 4H, $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}[\text{O}]$).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] 168.9 ($2\times\text{C}_q$, $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}[\text{O}]$), 166.1 (C_q , $\text{OCH}_2\text{CO}[\text{O}]$), 72.0, 71.4, 70.7 ($4\times\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 66.6 ($\text{OCH}_2\text{CO}[\text{O}]$), 59.1 (CH_2OCH_3), 25.7 ($2\times\text{CH}_2$, $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}[\text{O}]$).

5.4.1.2 N_{α} -Boc- N_{ϵ} -(2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetyl)-L-Lysin (**Boc- $K^{\epsilon\text{OEG}}$**)^[377]

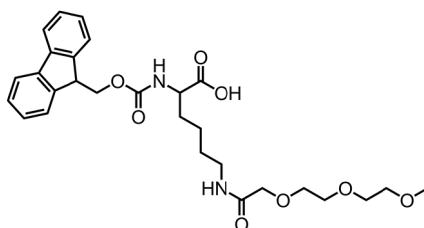


N_{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-Lysin (2.00 g, 8.12 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit NaHCO_3 (0.92 g, 10.95 mmol, 1.35 Äq.) in 180 mL THF/MQH₂O (1:1, v/v) aufgenommen und eine Lösung von **OEG-OSu** (2.35 g, 8.54 mmol, 1.05 Äq.) in 5 mL THF über einen Zeitraum von 25 min hinzugefügt. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die organische Phase unter vermin-

derem Druck entfernt. Der wässrige Rückstand wurde mit HCl auf pH 3 angesäuert und mit EtOAc (7 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurde **Boc-K^{εOEG}** (3.07 g, 7.55 mmol, 94 %) in Form eines farblosen Öls erhalten.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] 4.32-4.27 (m, 1H, α-CH^{Lys}), 4.00 (s, 2H, NH[CO]CH₂O), 3.71-3.66 (m, 6H, OCH₂CH₂OCH₂CH₂O), 3.60-3.57 (m, 2H, OCH₂CH₂OCH₃), 3.38 (s, 3H, CH₂OCH₃), 3.35-3.25 (m, 2H, ε-CH₂^{Lys}), 1.88-1.80 (m, 1H, β-CH₂^{Lys}), 1.80-1.72 (m, 1H, β-CH₂^{Lys}), 1.64-1.50 (m, 2H, δ-CH₂^{Lys}), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.40-1.34 (m, 2H, γ-CH₂^{Lys}).

5.4.1.3 *N*_α-Fmoc-*N*_ε-(2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetyl)-L-Lysin (**Fmoc-K^{εOEG}**)^[378]



Boc-K^{εOEG} (3.07 g, 7.55 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 50 mL TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v) gelöst und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand im Feinvakuum getrocknet. Das Boc-entschützte Intermediat wurde in 100 mL MQH₂O/MeCN (1:1, v/v) aufgenommen und mit einem Eisbad auf eine Temperatur von ca. 0 °C gekühlt. Während des Rührens wurde der pH-Wert der Reaktionslösung mittels DIPEA auf pH 8–9 eingestellt, eine Lösung von Fmoc-OSu (3.31 g, 9.81 mmol, 1.30 Äq.) in 70 mL MeCN tropfenweise hinzugefügt und nach 1 h das Eisbad entfernt. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung regelmäßig kontrolliert und ggf. mittels DIPEA erneut auf pH 8–9 eingestellt. Nach dem Rühren über Nacht wurde die organische Phase unter vermindertem Druck entfernt, der wässrige Rückstand mit einer 1 M HCl auf pH 2 angesäuert und mit EtOAc (7 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel unter Verwendung eines Laufmittelgradienten von 100 % EtOAc → EtOAc/MeOH (9:1, v/v) mit 0.1 % HCOOH (R_F = 0.13) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck (Feinvakuum) und Lyophilisation wurde das Lysin-Derivat **Fmoc-K^{εOEG}** (2.74 g, 5.18 mmol, 70 %) in Form eines weißen Feststoffes erhalten.

Fmoc-K^{εOEG} wurde mittels UHPLC und ESI-MS (vgl. **Abbildung E2**) sowie mittels ¹H NMR und ¹³C NMR charakterisiert.

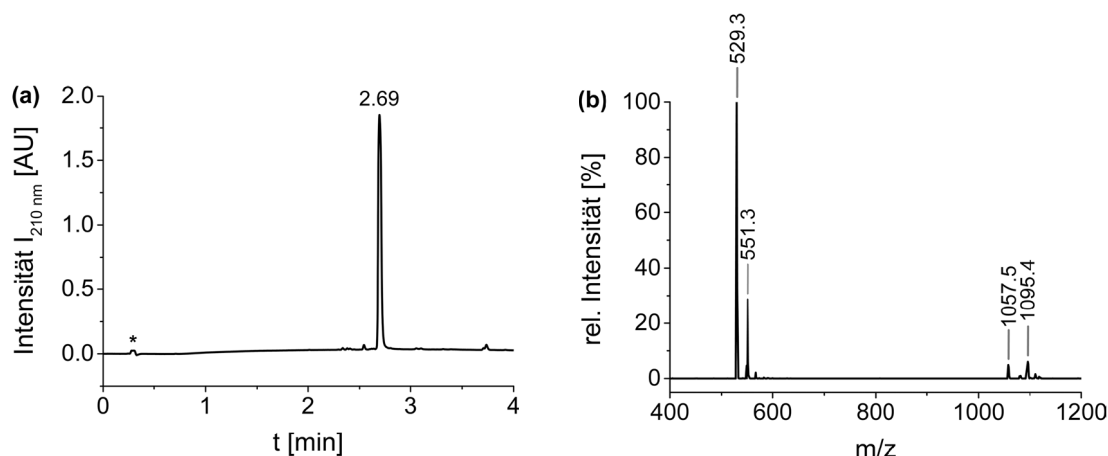


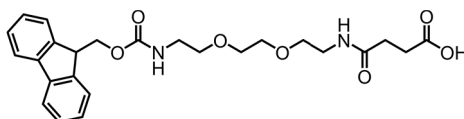
Abbildung E2. Charakterisierung von **Fmoc-K ϵ OEG**: UHPLC-Chromatogramm (Gradient: 20 – 80 % B, 4 min, 210 nm), * Injektionssignal (a). ESI-MS-Spektrum (b).

Fmoc-K ϵ OEG [C₂₈H₃₆N₂O₈]: 528.59 g·mol⁻¹, UHPLC (210 nm): *t_R* = 2.69 min (20 – 80 % B, 4 min), ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ *ber.* 529.6, *gef.* 529.3; [M+Na]⁺ *ber.* 551.6, *gef.* 551.3; [2M+H]⁺ *ber.* 1058.2, *gef.* 1057.5; [2M+K]⁺ *ber.* 1096.1, *gef.* 1095.4.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] 7.74 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×ArH^{Fmoc}), 7.59 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, 2×ArH^{Fmoc}), 7.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2×ArH^{Fmoc}), 7.28 (dt, *J* = 11.4, 2.6 Hz, 2H, 2×ArH^{Fmoc}), 4.37 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, CHCH₂[O]CO), 4.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, Aryl-CH-Aryl), 3.99 (s, 2H, NH[CO]CH₂O), 3.63-3.59 (m, 6H, OCH₂CH₂OCH₂CH₂O), 3.55-3.51 (m, 2H, OCH₂CH₂OCH₃), 3.34 (s, 3H, CH₂OCH₃), 3.30 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, α -CH^{Lys}), 1.95-1.74 (m, 2H, ϵ -CH₂^{Lys}), 1.62-1.29 (m, 6H, β -CH₂^{Lys}, γ -CH₂^{Lys}, δ -CH₂^{Lys}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] 175.0 (C_q, CHCO[O]H), 171.3 (C_q, NHC[O]CH₂O), 156.5 (OC[O]NH), 144.3, 144.2, 141.6, 128.1, 127.5, 125.5, 120.3 (12×ArCH^{Fmoc}), 72.0 (NHC[O]CH₂O), 71.2, 70.6, 70.4, 70.3 (4×CH₂, OCH₂CH₂OCH₂CH₂O), 67.2 (Aryl-CH₂O), 59.2 (CH₂OCH₃), 54.3 (α -CH^{Lys}), 47.5 (Aryl-CH-Aryl), 38.6 (ϵ -CH₂^{Lys}), 31.8 (β -CH₂^{Lys}), 29.0 (δ -CH₂^{Lys}), 22.3 (γ -CH₂^{Lys}).

5.4.2 SYNTHESE VON *N*_A-FMOC-4-(2-[2-(2-AMINOETHOXY)ETHOXY]ETHYLAMINO)-4-OXOBUTANSÄURE (FMOC-OEG-COOH)^[351, 352]



2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamin) (7.41 mL, 50 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 100 mL MeCN aufgenommen und unter kräftigem Rühren tropfenweise mit einer Lösung von Bernsteinsäureanhydrid (5.00 g, 50 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL MeCN versetzt. Die Reaktion wurde für 2.5 h gerührt und danach das Lösungsmittel vom wachsartigen Intermediat 4-(2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethylamino)-4-oxobutansäure abdekantiert. Das Intermediat wurde anschließend in 200 mL MQH₂O/MeCN (1:1, v/v) aufgenommen und für 30 min mit einem Eisbad auf eine Temperatur von 0 °C gekühlt. Während des Rührens wurde der pH-Wert der Lösung mittels DIPEA auf pH 8 – 9 eingestellt und eine Lösung von Fmoc-OSu (21.93 g, 65 mmol, 1.30 Äq.) in

70 mL MeCN tropfenweise hinzugefügt. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt und der pH-Wert der Lösung mittels DIPEA erneut auf pH 8 – 9 eingestellt. Nach dem Rühren über Nacht wurde die organische Phase unter vermindertem Druck entfernt, der wässrige Rückstand mit einer 1 M HCl auf pH 2 angesäuert und mit EtOAc (4 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel unter Verwendung eines Laufmittelgradienten von 100 % EtOAc → EtOAc/MeOH (9:1, v/v) mit 0.1 % HCOOH (*R_F* = 0.32) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck (Feinvakuum) wurde **Fmoc-OEG-COOH** (8.21 g, 17 mmol, 35 %) in Form eines farblosen Öls erhalten.

Fmoc-OEG-COOH wurde mittels analytischer UHPLC und ESI-MS (vgl. **Abbildung E3**) sowie mittels ¹H NMR und ¹³C NMR charakterisiert.

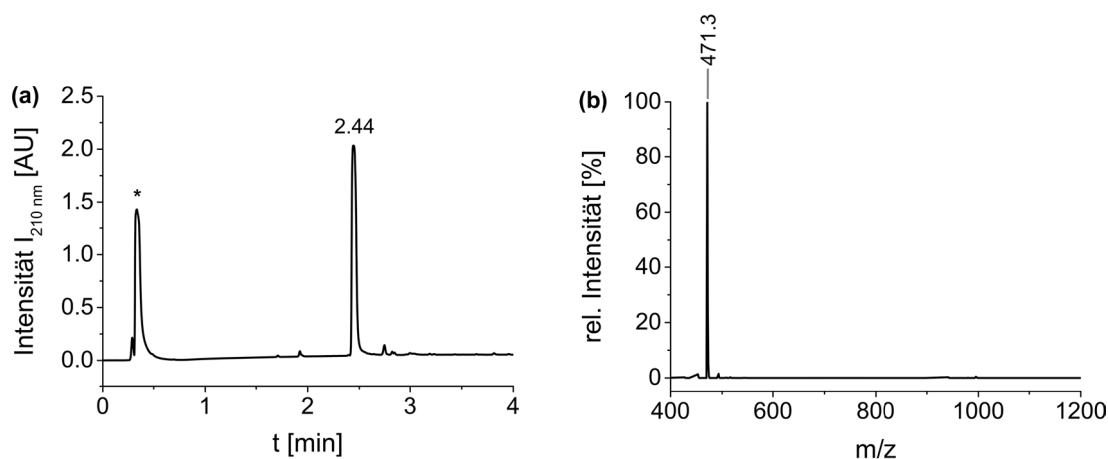


Abbildung E3. Charakterisierung von **Fmoc-OEG-OH**: UHPLC-Chromatogramm (Gradient: 20 – 80 % B, 4 min), 210 nm. * Signal des Lösungsmittelrückstandes (a). ESI-MS-Spektrum (b).

Fmoc-OEG-COOH [C₂₅H₃₀N₂O₇]: 470.51 g·mol⁻¹, UHPLC (210 nm): *t_R* = 2.44 min (20 – 80 % B, 4 min); ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ *ber.* 471.5, *gef.* 471.3.

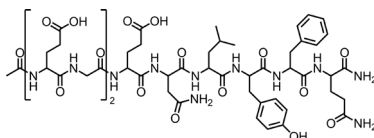
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2×ArH^{Fmoc}), 7.57 (d, *J* = 26.5 Hz, 2H, 2×ArH^{Fmoc}), 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×ArH^{Fmoc}), 7.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2×ArH^{Fmoc}), 4.44 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 24.2 Hz, 2H, CH₂CO), 4.27-4.19 (m, 1H, CH), 3.65-3.33 (m, 12H, CH₂-O), 2.69-2.65 (m, 2H, CH₂NHCO), 2.51-2.47 (m, 2H, CH₂NHCO).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] 177.4 (C_q, CO[O]), 175.1 (C_q, NHC[O]CH₂), 158.2 (C_q, OC[O]NHCH₂), 144.0, 143.8, 141.5, 127.9, 127.2, 125.1, 125.1, 120.1 (12×ArCH^{Fmoc}), 70.4, 70.3, 70.0, 69.7 (4×CH₂, CH₂OCH₂CH₂OCH₂), 67.7 (Aryl-CH₂O), 47.3 (Aryl-CH-Aryl), 41.5 und 39.3 (2×CH₂CH₂NHCO), 31.3 (CH₂-CO[O]), 30.1 (NHC[O]CH₂).

Die Signale im ¹H NMR bei δ = 4.05 (q), 1.97 (s) und 1.18 (t) ppm und im ¹³C NMR bei δ = 171.3, 60.5, 21.2 und 14.3 ppm können dem Rückstand des nicht vollständig entfernen Lösungsmittels EtOAc zugeordnet werden.^[379]

5.5 Charakterisierung der Peptide und Peptid-PEG-Konjugate

5.5.1 Ac-(EG)₂-ENLYFQ-CONH₂ (IF4^{CHEM})



IF4^{CHEM} wurde nach **Protokoll 1a** synthetisiert und nach **Protokoll 4** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 20 % B, 2.0 – 30.0 min: 20 – 50 % B, 210 nm). **IF4^{CHEM}** wurde mittels analytischer UHPLC und ESI-MS (vgl. **Abbildung E4**) sowie mittels FT-IR charakterisiert.

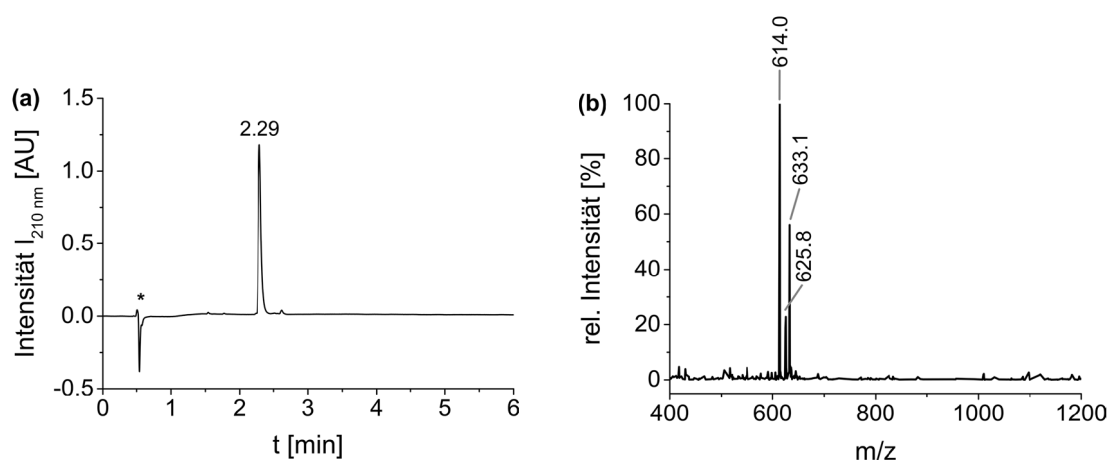
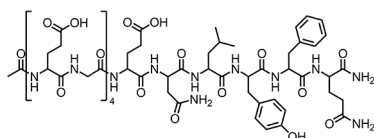


Abbildung E4. Charakterisierung von **IF4^{CHEM}**: UHPLC-Chromatogramm (Gradient: 15 – 50 % B, 6 min, 210 nm), * Injektionssignal (a). ESI-MS-Spektrum (b).

IF4^{CHEM} [C₅₄H₇₅N₁₃O₂₀]: 1226.25 g·mol⁻¹, UHPLC (210 nm): *t_R* = 2.29 min (15 – 50 % B, 6 min); ESI-MS (*m/z*): [M+2H]²⁺ *ber.* 614.1, *gef.* 614.0, [M+H+Na]²⁺ *ber.* 625.1, *gef.* 625.8, [M+H+K]²⁺ *ber.* 633.2, *gef.* 633.1.

FT-IR (*ν* [cm⁻¹]): 3282 (*m*), 2874 (*m*), 1733 (*vw*), 1629 (*s*), 1539 (*m*), 1446 (*vw*), 1091 (*m*), 949 (*vw*), 751 (*vw*).

5.5.2 Ac-(EG)₄-ENLYFQ-CONH₂ (IF7^{CHEM})



IF7^{CHEM} wurde nach **Protokoll 1a** synthetisiert und nach **Protokoll 4** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 20 % B, 2.0 – 30.0 min: 20 – 50 % B, 210 nm). **IF7^{CHEM}** wurde mittels analytischer UHPLC und ESI-MS (vgl. **Abbildung E5**) sowie mittels FT-IR charakterisiert.

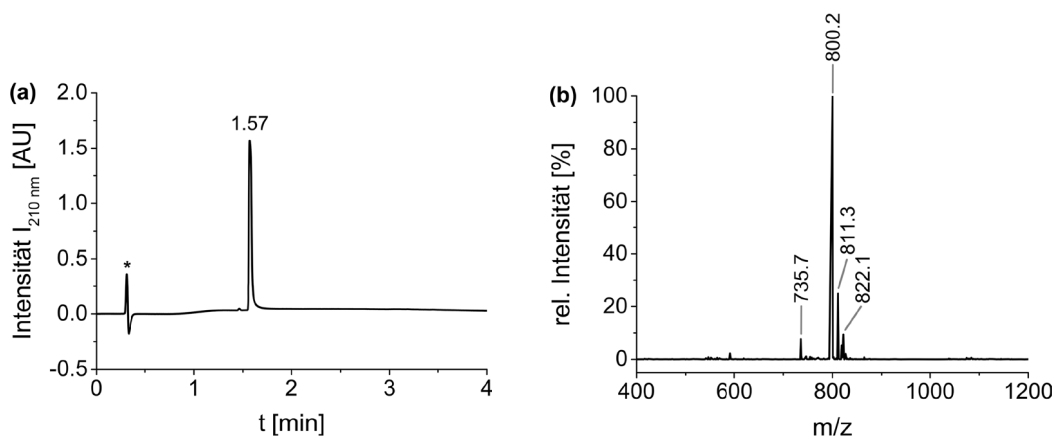
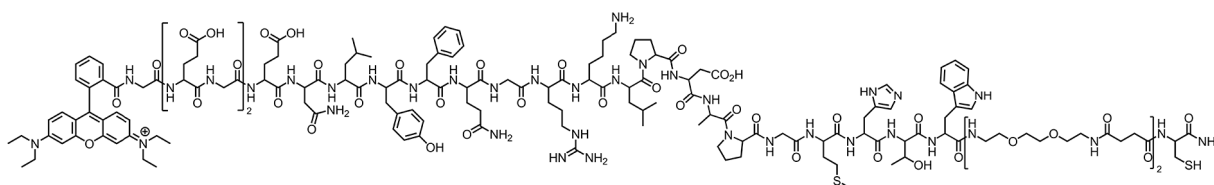


Abbildung E5. Charakterisierung von **IF7^{CHEM}**: UHPLC-Chromatogramm (Gradient: 10 – 90 % B, 4 min, 210 nm), * Injektionssignal (a). ESI-MS-Spektrum (b).

IF7^{CHEM} [$C_{68}H_{95}N_{17}O_{28}$]: 1598.58 g·mol⁻¹, UHPLC (210 nm): t_R = 1.57 min (10 – 90 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): $[M+2H]^{2+}$ ber. 800.3, gef. 800.2; $[M+H+Na]^{2+}$ ber. 811.3, gef. 811.3; $[M+2Na]^{2+}$ ber. 822.3, gef. 822.1, $[M-E+2H]^{2+}$ ber. 735.7, gef. 735.7.

FT-IR (ν [cm⁻¹]): 3284 (m), 2875 (m), 1632 (s), 1525 (m), 1447 (vw), 1447 (vw), 1249 (vw), 1095 (m), 949 (vw), 751 (vw).

5.5.3 **RhB-(EG)₂-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-[OEG]₂-C-CONH₂ (PEP^{RhB})**



PEP^{RhB} wurde nach **Protokoll 1b** synthetisiert und nach **Protokoll 5** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 20 % B, 2.0 – 30.0 min: 20 – 40 % B, 210 nm). **PEP^{RhB}** wurde mittels analytischer UHPLC und ESI-MS (vgl. **Abbildung E6**) sowie mittels FT-IR charakterisiert.

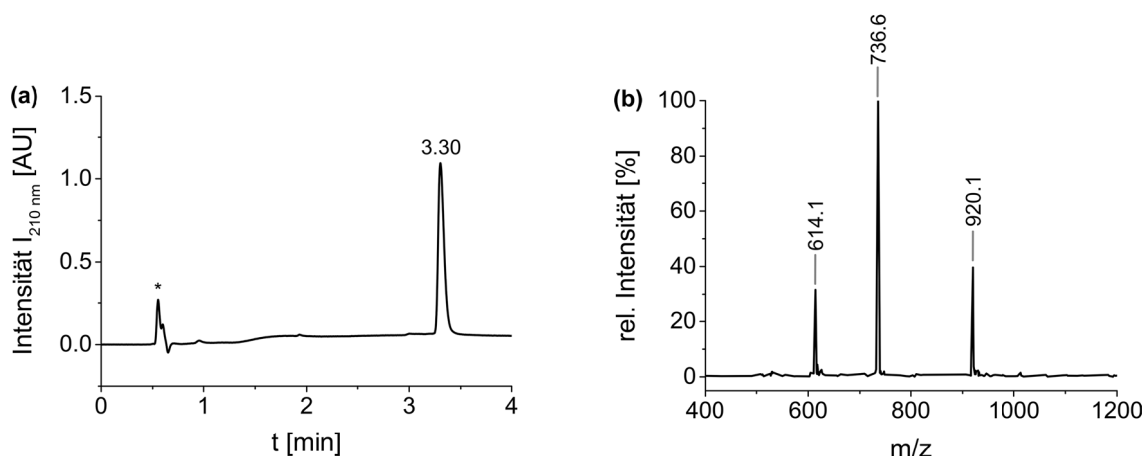
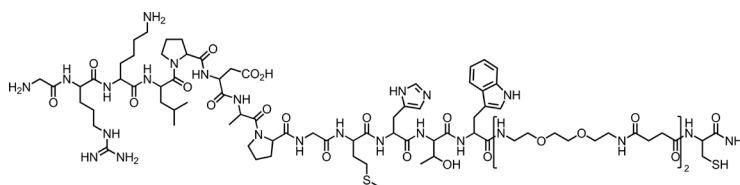


Abbildung E6. Charakterisierung von **PEP^{RhB}**: UHPLC-Chromatogramm (Gradient: 10 – 70 % B, 4 min, 210 nm), * Injektionssignal (a). ESI-MS-Spektrum (b).

PEP^{RhB} [C₁₇₀H₂₄₄N₄₁O₄₇S₂]: 3678.13 g·mol⁻¹, UHPLC (210 nm): t_R = 3.30 min (10 – 70 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): [M+4H]⁴⁺ ber. 920.5, gef. 920.1; [M+5H]⁵⁺ ber. 736.6, gef. 736.6; [M+6Na]⁶⁺ ber. 614.0, gef. 614.1.

5.5.4 H₂N-G-RKLPDAPGMHTW-[OEG]₂-C-CONH₂ (PEP^{TBP})



PEP^{TBP} wurde nach **Protokoll 1b** synthetisiert und nach **Protokoll 5** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 5 % B, 2.0 – 30.0 min: 5 – 30 % B, 210 nm). **PEP^{TBP}** wurde mittels analytischer UHPLC und ESI-MS (vgl. **Abbildung E7**) sowie mittels FT-IR charakterisiert.

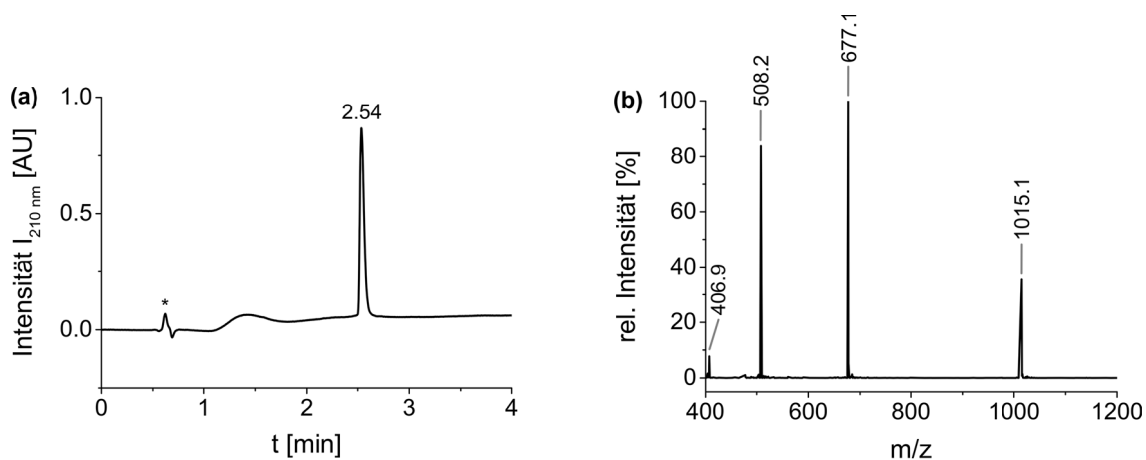
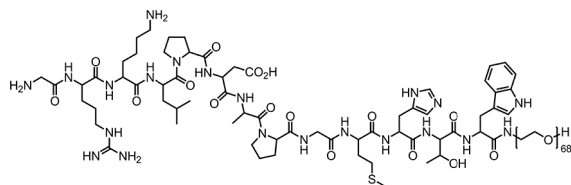


Abbildung E7. Charakterisierung von **PEP^{TBP}**: UHPLC-Chromatogramm (Gradient: 5 – 50 % B, 4 min, 210 nm), * Injektionssignal (a). ESI-MS-Spektrum (b).

PEP^{TBP} [C₈₈H₁₄₂N₂₆O₂₅S₂]: 2028.36 g·mol⁻¹, UHPLC (210 nm): t_R = 2.54 min (5 – 50 % B, 4 min), ESI-MS (m/z): [M+2H]²⁺ *ber.* 1015.2, *gef.* 1015.1; [M+3H]³⁺ *ber.* 677.1, *gef.* 677.1; [M+4H]⁴⁺ *ber.* 508.1, *gef.* 508.2, [M+5H]⁵⁺ *ber.* 406.7, *gef.* 406.9.

5.5.5 G-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (G-TBP-PEG^{CHEM})



G-TBP-PEG^{CHEM} wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E8**) sowie mittels FT-IR.

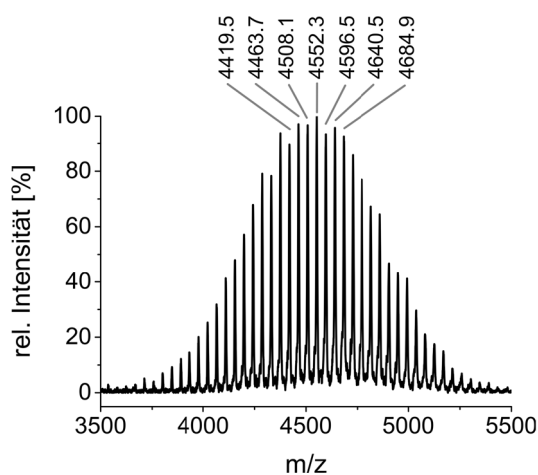
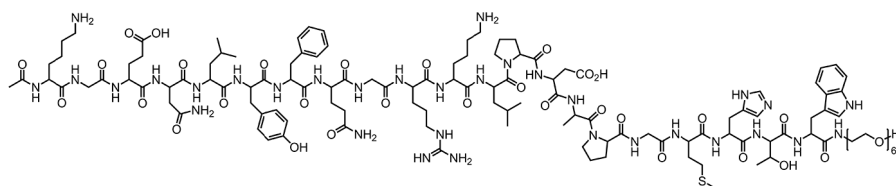


Abbildung E8. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **G-TBP-PEG^{CHEM}**.

MALDI-ToF-MS [m/z]: [M+H]⁺ *ber.* 4549.4, *gef.* 4552.3; $\Delta M = 44$ m/z, charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEGn}} = 4548.37$ g·mol⁻¹ (n = 70).

FT-IR (ν [cm⁻¹]): 3293 (*b*), 2885 (*m*), 1666 (*m*), 1535 (*w*), 1464 (*w*), 1343 (*w*), 1280 (*w*), 1240 (*w*), 1201 (*w*), 1101 (*s*), 958 (*w*), 841 (*w*).

5.5.6 Ac-KG-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S1-PEG)



S1-PEG wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E9**) sowie mittels FT-IR.

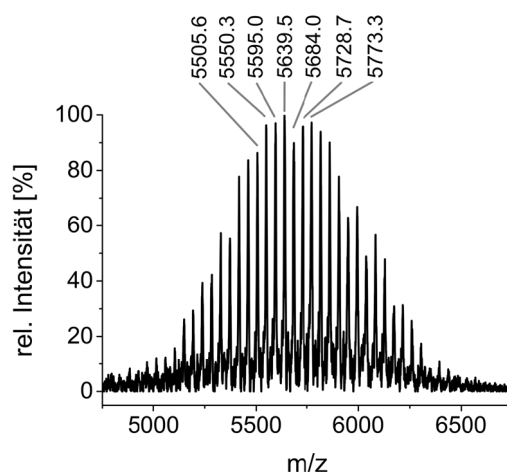
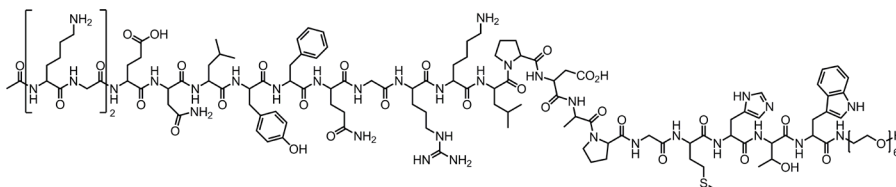


Abbildung E9. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **S1-PEG**.

MALDI-ToF-MS $[m/z]$: $[M+Na]^+$ ber. 5637.5, gef. 5639.5; $\Delta M = 44 \text{ m/z}$, charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{PEPTID}} + M_{\text{PEG}n} = 5614.54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 71$).

FT-IR (ν $[\text{cm}^{-1}]$): 3284 (*b*), 2877 (*m*), 1661 (*m*), 1627 (*m*), 1524 (*w*), 1456 (*w*), 1347 (*w*), 1282 (*vw*), 1243 (*vw*), 1120 (*vw*), 1100 (*s*), 954 (*w*), 839 (*w*), 710 (*w*), 587 (*w*), 506 (*vw*), 463 (*w*).

5.5.7 Ac-(KG)₂-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S2-PEG)

S2-PEG wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E10**) sowie mittels FT-IR.

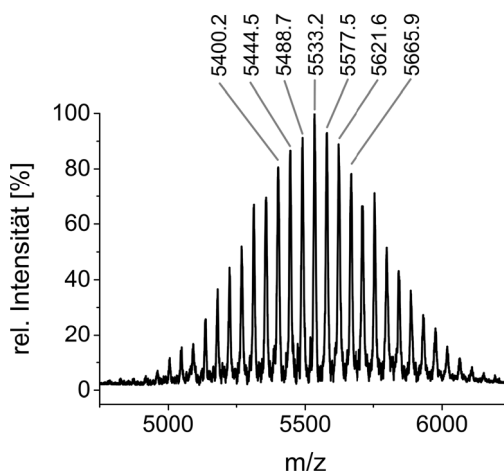
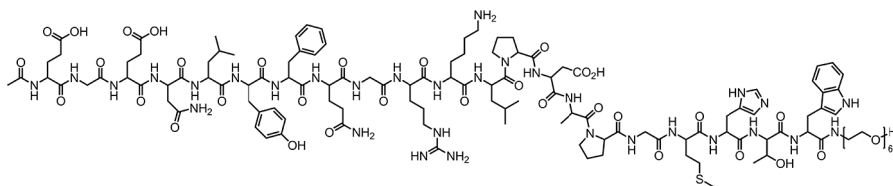


Abbildung E10. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **S2-PEG**.

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+H]^+$ *ber.* 5536.5, *gef.* 5533.2; $\Delta M = 44$ m/z , charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{PEPTID}} + M_{\text{PEGn}} = 5535.44$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 65$).

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3284 (*b*), 2880 (*m*), 1627 (*m*), 1523 (*w*), 1460 (*w*), 1346 (*w*), 1281 (*w*), 1241 (*vw*), 1200 (*vw*), 11180 (*vw*), 1103 (*s*), 956 (*w*), 839 (*w*), 716 (*vw*), 590 (*vw*), 506 (*vw*), 463 (*vw*).

5.5.8 AC-EG-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S3-PEG)



S3-PEG wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E11**) sowie mittels FT-IR.

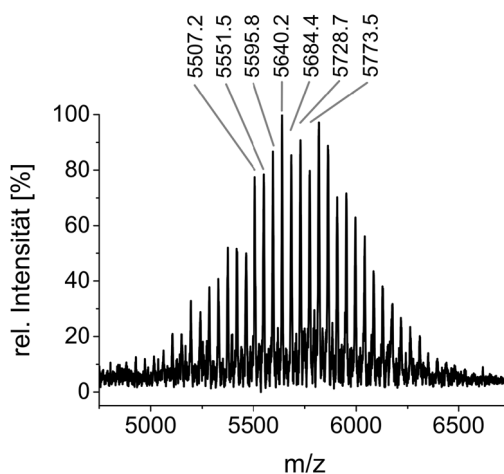
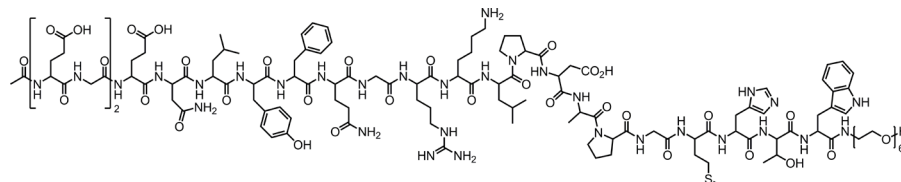


Abbildung E11. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **S3-PEG**.

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+Na]^+$ ber. 5638.5, gef. 5640.2; $\Delta M = 44$ m/z, charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEGn}} = 5615.48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 71$).

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3280 (*b*), 2881 (*m*), 1660 (*m*), 1625 (*m*), 1523 (*w*), 1459 (*w*), 1345 (*w*), 1281 (*vw*), 1241 (*vw*), 1200 (*vw*), 1102 (*s*), 956 (*w*), 840 (*w*), 695 (*vw*), 586 (*w*), 506 (*vw*), 463 (*w*).

5.5.9 AC-(EG)₂-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S4-PEG)



S4-PEG wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E12**) und FT-IR sowie mittels analytischer UHPLC-MS nach CNBr-Spaltung der Methionin-Seitenkette des Peptidteils gemäß **Protokoll 7**.

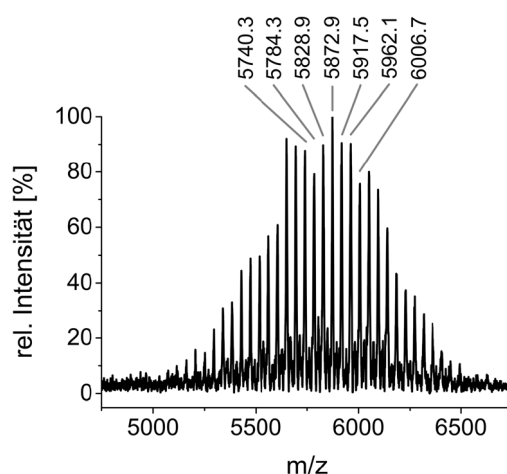


Abbildung E12. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **S4-PEG**.

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+Na]^+$ ber. 5868.7, gef. 5872.9; $\Delta M = 44$ m/z, charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEGn}} = 5845.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 72$).

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3284 (*b*), 2881 (*m*), 1659 (*m*), 1524 (*w*), 1460 (*w*), 1347 (*w*), 1281 (*vw*), 1241 (*vw*), 1200 (*vw*), 1103 (*s*), 956 (*w*), 839 (*w*), 589 (*vw*), 506 (*vw*), 463 (*vw*).

5.5.9.1 Reinheitsbestimmung von **S4-PEG** durch CNBr-Spaltung

Die Reinheitsbestimmung des Peptid-PEG-Konjugates **S4-PEG** erfolgte durch Identifizierung der Peptidfragmente nach CNBr-Spaltung gemäß **Protokoll 7** mittels analytischer UHPLC-MS (Gradient: 15 – 50 % B, 6 min, 210 nm). Die quantitative Auswertung des Verhältnisses der Signalfächen wurde mit Hilfe der Chromatographiedatensoftware Empower 3 der Firma Waters vorgenommen (vgl. **Abbildung E13**).

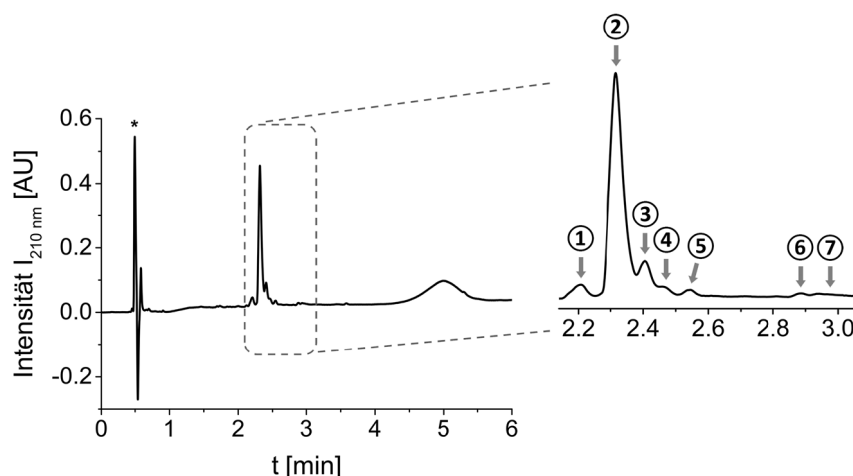


Abbildung E13. UHPLC-Chromatogramm von **S4-PEG** nach CNBr-Spaltung zur Reinheitsbestimmung des Peptid-Polymer-Konjugates (Gradient: 15 – 50 % B, 6 min, 210 nm), * Injektionssignal.

UHPLC-MS (210 nm): t_R = 2.32 und 2.41 min (15 – 50 % B, 6 min), 87 % Reinheit.

Die Zuordnung der UV-Vis-Signale No. ① bis No. ⑦ zu den entsprechenden Spaltprodukten unter Angabe der jeweiligen Retentionszeiten kann **Tabelle E3** entnommen werden.

Tabelle E3. Zuordnung der UV-Vis-Signale No. ① bis No. ⑦ des UHPLC-Chromatogrammes von **S4-PEG** nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E13**) zur Bestimmung der Reinheit des Peptid-Polymer-Konjugates unter Angabe der Retentionszeiten, der Signalfäche und der identifizierten Fragmente.

Signal No.	Retentionszeit t_R	Signalfäche	Identifizierte Fragmente
①	2.21 min	5 %	HS, HSL [$+tBu$], Asp ^{HYDROLYSE}
②	2.32 min	76 %	HSL
③	2.41 min	11 %	HS ^{FORM} , Asp ^{IMID} -HSL
④	2.46 min	3 %	HSL, Asp ^{IMID} -HSL, HSL [-N], HS ^{FORM} [-EGE], HSL [- (EG) ₂]
⑤	2.54 min	2 %	Asp ^{IMID} -HSL, HSL [$+tBu$], HSL [-E], HSL [- (EG) ₂ E]
⑥	2.88 min	1 %	HSL [- (EG) ₂ EN]
⑦	2.94 min	2 %	HSL [-Ac-N], HSL [- (EG) ₂ EN], HSL [-G], HSL ^{FORM} [- (EG) ₂ EN]

Die ESI-MS-Spektren des UHPLC-Chromatogrammes von **S4-PEG** nach der CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E13**) sind in den **Abbildungen E14-E17** zusammengestellt.

① ESI-MS (m/z): **HS** [$C_{97}H_{146}N_{26}O_{34}$]: 2220.35 g·mol⁻¹, [M+2H]²⁺ ber. 1111.2; gef. 1110.9, [M+3H]³⁺ ber. 741.1, gef. 741.2; [M+2H+Na]³⁺ ber. 748.5, gef. 748.4; **HSL [$+tBu$]** [$C_{101}H_{152}N_{26}O_{33}$]: 2258.44 g·mol⁻¹; [M+3H]³⁺ ber. 753.8, gef. 753.6; [M+4H]⁴⁺ ber. 565.6, gef. 565.6; **Asp^{HYDROLYSE}** [$C_{83}H_{124}N_{22}O_{29}$]: 1894.00 g·mol⁻¹ [M+2H]²⁺ ber. 948.0, gef. 947.8; [M+3H]³⁺ ber. 632.3, gef. 632.3; [M+3H+K]⁴⁺ ber. 484.0, gef. 484.0.

② ESI-MS (m/z): **HSL** [$C_{97}H_{144}N_{26}O_{33}$]: 2202.34 g·mol⁻¹, [M+2H]²⁺ ber. 1102.2, gef. 1102.0; [M+3H]³⁺ ber. 735.1, gef. 735.2.

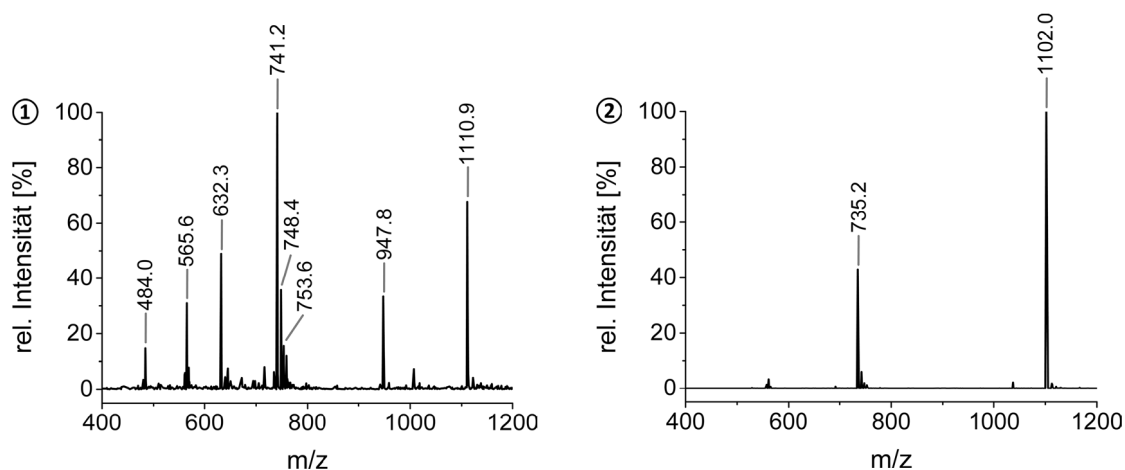


Abbildung E14. ESI-MS-Spektren der UV-Vis-Signale No. ① (links) und No. ② (rechts) des UHPLC-Chromatogrammes von **S4-PEG** nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E13**).

③ ESI-MS (m/z): **HS^{FORM}** [$C_{98}H_{146}N_{26}O_{35}$]: 2248.36 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1125.2, gef. 1125.1; $[M+3H]^{3+}$ ber. 750.5, gef. 750.5; $[M+2H+Na]^{3+}$ ber. 757.6, gef. 757.9; $[M+3H+K]^{4+}$ ber. 572.6, gef. 572.6; **Asp^{IMID}-HSL** [$C_{97}H_{142}N_{26}O_{32}$]: 2184.32 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1093.2, gef. 1093.1; $[M+3H]^{3+}$ ber. 729.1, gef. 729.2.

④ ESI-MS (m/z): **HSL** [$C_{97}H_{144}N_{26}O_{33}$]: 2202.34 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1102.2, gef. 1101.9; $[M+H+Na]^{2+}$ ber. 1113.2, gef. 1114.7; $[M+2Na]^{2+}$ ber. 1124.2, gef. 1125.0; $[M+3H]^{3+}$ ber. 735.1, gef. 735.2; $[M+2H+Na]^{3+}$ ber. 742.5, gef. 743.7; $[M+H+2Na]^{3+}$ ber. 749.8, gef. 750.8; **Asp^{IMID}-HSL** [$C_{97}H_{142}N_{26}O_{32}$]: 2184.32 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1093.2, gef. 1093.0; $[M+Na+2K]^{3+}$ ber. 761.4, gef. 761.8; **HSL [-N]** [$C_{93}H_{138}N_{24}O_{31}$]: 2088.23 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1045.1, gef. 1044.9; $[M+3H]^{3+}$ ber. 697.1, gef. 697.0; $[M+3H+K]^{4+}$ ber. 532.6, gef. 532.2; $[M+4K]^{4+}$ ber. 561.2, gef. 561.4; **HS^{FORM} [-EGE]** [$C_{86}H_{129}N_{23}O_{26}$]: 1933.08 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 967.6, gef. 967.2; $[M+3Na]^{3+}$ ber. 667.4, gef. 668.1; **HSL [- (EG)₂]** [$C_{83}H_{124}N_{22}O_{25}$]: 1830.01 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 916.0, gef. 916.4; $[M+3H]^{3+}$ ber. 611.0, gef. 610.9.

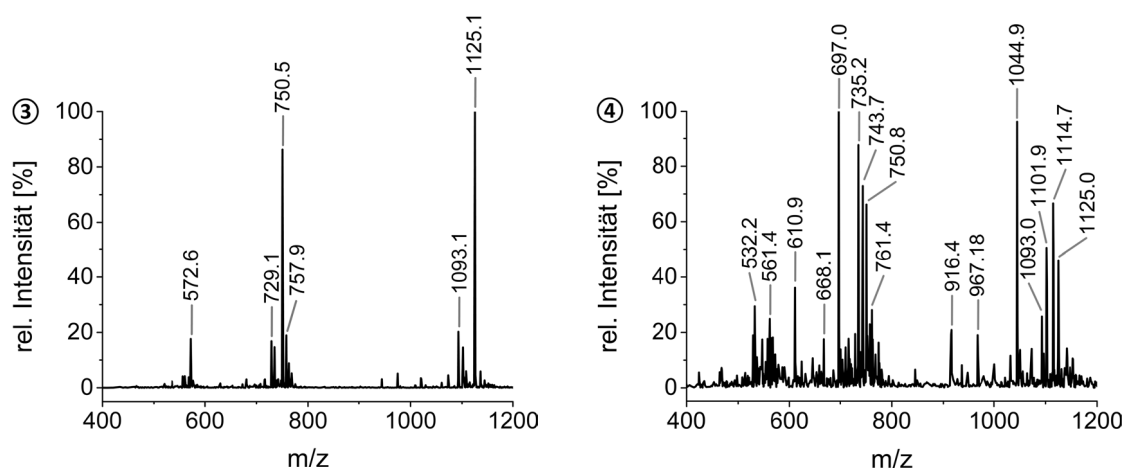


Abbildung E15. ESI-MS-Spektren der UV-Vis-Signale No. ③ (links) und No. ④ (rechts) des UHPLC-Chromatogrammes von **S4-PEG** nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E13**).

⑤ ESI-MS (m/z): **Asp^{IMID}-HSL** [$C_{97}H_{142}N_{26}O_{32}$]: 2184.32 g·mol⁻¹, [M+2H]²⁺ *ber.* 1093.2, *gef.* 1093.3; [M+3H]³⁺ *ber.* 729.1, *gef.* 729.1; [M+3H+K]⁴⁺ *ber.* 556.6, *gef.* 556.6; **HSL [+tBu]** [$C_{101}H_{152}N_{26}O_{33}$]: 2258.44 g·mol⁻¹; [M+2H]²⁺ *ber.* 1130.3, *gef.* 1130.0; [M+3H]³⁺ *ber.* 753.8, *gef.* 753.7; **HSL [-E]** [$C_{92}H_{137}N_{25}O_{30}$]: 2073.22 g·mol⁻¹, [M+2H]²⁺ *ber.* 1037.6, *gef.* 1037.8; [M+3H]³⁺ *ber.* 692.1, *gef.* 692.4; [M+3H+K]⁴⁺ *ber.* 528.8, *gef.* 529.0; **HSL [- (EG)₂E]** [$C_{78}H_{117}N_{21}O_{22}$]: 1700.89 g·mol⁻¹ [M+2H]²⁺ *ber.* 851.5, *gef.* 851.7; [M+3H]³⁺ *ber.* 568.0, *gef.* 567.9; [M+2H+Na]³⁺ *ber.* 575.3, *gef.* 575.6; [M+2H+K]³⁺ *ber.* 580.7, *gef.* 580.7; [M+3H+K]⁴⁺ *ber.* 435.8, *gef.* 435.9.

⑥ ESI-MS (m/z): **HSL [- (EG)₂EN]** [$C_{74}H_{111}N_{19}O_{20}$]: 1586.79 g·mol⁻¹ [M+2H]²⁺ *ber.* 794.4, *gef.* 794.3; [M+3H]³⁺ *ber.* 529.9, *gef.* 529.9; [M+2H+K]³⁺ *ber.* 542.6, *gef.* 542.5; [M+3H+K]⁴⁺ *ber.* 407.2, *gef.* 407.3.

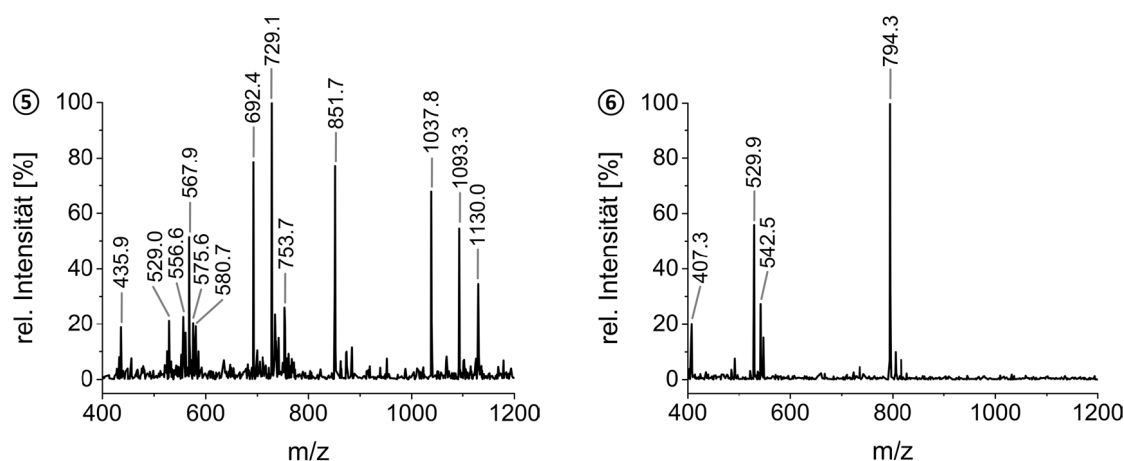


Abbildung E16. ESI-MS-Spektren der UV-Vis-Signale No. ⑤ (links) und No. ⑥ (rechts) des UHPLC-Chromatogrammes von **S4-PEG** nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E13**).

⑦ ESI-MS (m/z): **HSL [-Ac-N]** [$C_{91}H_{136}N_{24}O_{30}$]: 2046.20 g·mol⁻¹, [M+2H]²⁺ *ber.* 1024.1, *gef.* 1024.5; [M+H+Na]²⁺ *ber.* 1035.1, *gef.* 1034.9; [M+3H]³⁺ *ber.* 683.1, *gef.* 683.1; [M+2H+K]³⁺ *ber.* 695.8, *gef.* 695.9; [M+2H+2K]⁴⁺ *ber.* 531.6, *gef.* 532.0; **HSL [- (EG)₂EN]** [$C_{74}H_{111}N_{19}O_{20}$]: 1586.79 g·mol⁻¹ [M+2H]²⁺ *ber.* 794.4, *gef.* 794.5; **HSL [-G]** [$C_{95}H_{141}N_{25}O_{32}$]: 2145.28 g·mol⁻¹ [M+2H]²⁺ *ber.* 1073.7, *gef.* 1074.0; **HS^{FORM} [- (EG)₂EN]** [$C_{75}H_{113}N_{19}O_{22}$]: 1632.81 g·mol⁻¹ [M+2H]²⁺ *ber.* 817.0, *gef.* 817.4; [M+3H]³⁺ *ber.* 545.3, *gef.* 546.6; [M+4H]⁴⁺ *ber.* 428.3, *gef.* 428.1.

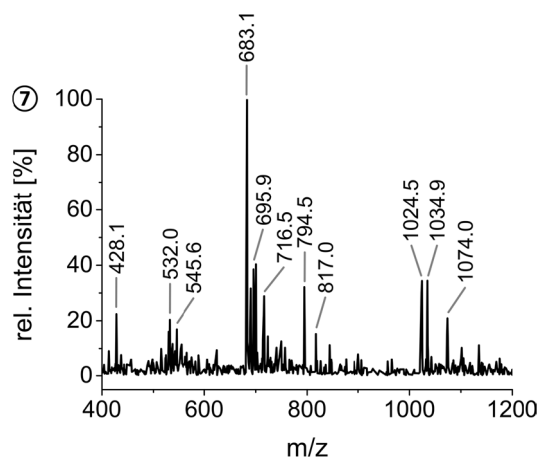
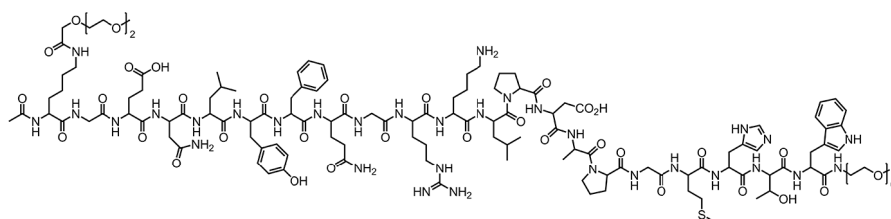


Abbildung E17. ESI-MS-Spektrum des UV-Vis-Signales No. ⑦ des UHPLC-Chromatogrammes von **S4-PEG** nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E13**).

5.5.10 Ac-K^EOEGG-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S5-PEG)

S5-PEG wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E18**) sowie mittels FT-IR.

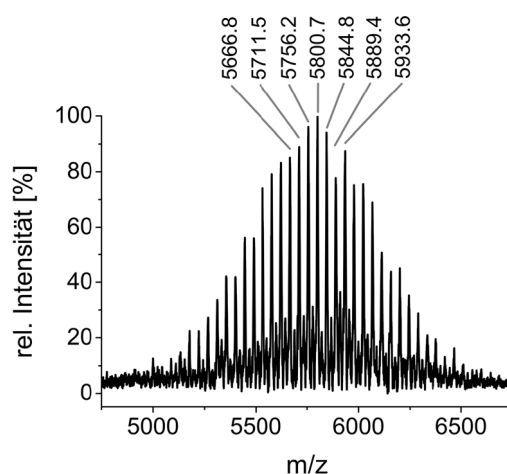
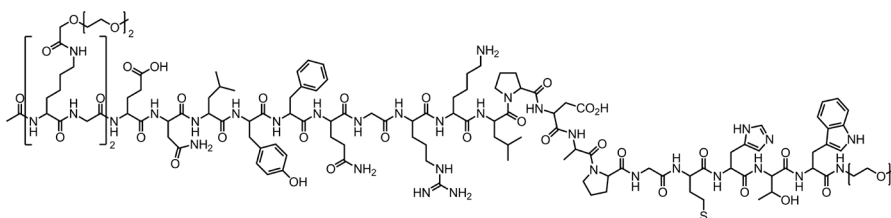


Abbildung E18. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **S5-PEG**.

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+Na]^+$ *ber.* 5797.7, *gef.* 5800.7; $\Delta M = 44$ m/z , charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG}n} = 5774.70$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 71$).

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3283 (*b*), 2879 (*m*), 1660 (*m*), 1627 (*m*), 1524 (*w*), 1457 (*w*), 1346 (*w*), 1282 (*vw*), 1243 (*vw*), 1200 (*vw*), 1101 (*s*), 955 (*w*), 842 (*w*), 711 (*vw*).

5.5.11 Ac-(K^EOEGG)₂-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (S6-PEG)

S6-PEG wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E19**) sowie mittels FT-IR.

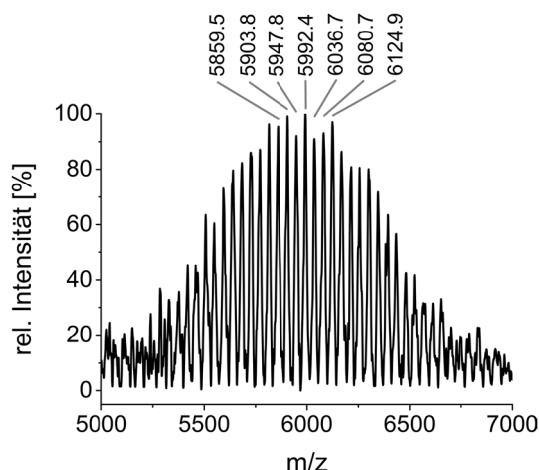
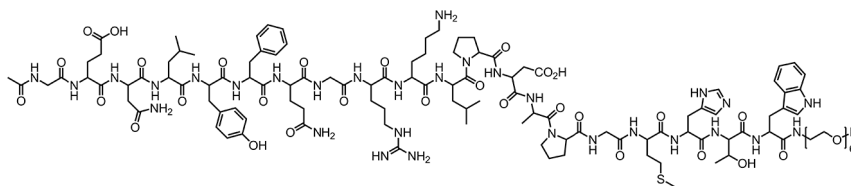


Abbildung E19. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **S6-PEG**.

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+H]^+$ ber. 5988.9, gef. 5992.4; $\Delta M = 44 m/z$, charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEGn}} = 5987.94 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 68$).

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3283 (*b*), 2881 (*m*), 1660 (*m*), 1524 (*w*), 1459 (*w*), 1345 (*w*), 1281 (*vw*), 1241 (*vw*), 1200 (*vw*), 1102 (*s*), 956 (*w*), 840 (*w*), 714 (*w*), 588 (*vw*), 506 (*vw*), 463 (*vw*).

5.5.12 AC-G-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW-BLOCK-PEG (EPITOP-TBP-PEG)



Epitop-TBP-PEG wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E20**) sowie mittels FT-IR.

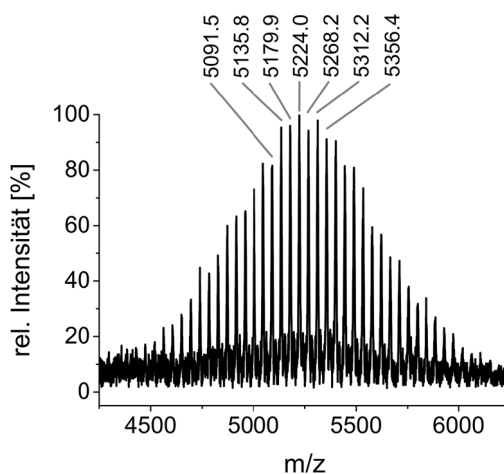
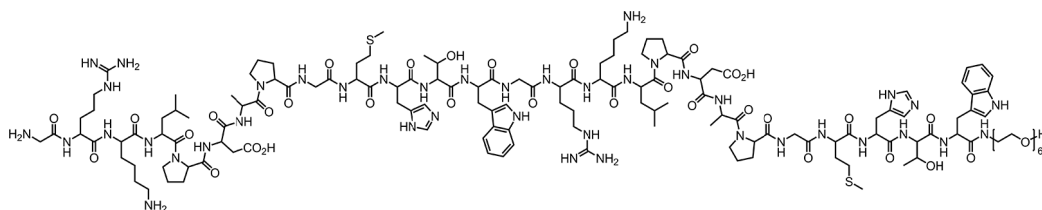


Abbildung E20. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **Epitop-TBP-PEG**.

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+H]^+$ *ber.* 5223.1, *gef.* 5224.0; $\Delta M = 44$ m/z , charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEGn}} = 5222.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 65$).

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3282 (*b*), 2877 (*m*), 1658 (*m*), 1625 (*m*), 1518 (*w*), 1465 (*w*), 1453 (*m*), 1343 (*w*), 1280 (*vw*), 1201 (*vw*), 1104 (*s*), 962 (*w*), 948 (*w*), 842 (*w*), 703 (*vw*), 507 (*vw*), 459 (*vw*).

5.5.13 (G-RKLPDAPGMHTW)₂-BLOCK-PEG ((G-TBP)₂-PEG^{CHEM})



(G-TBP)₂-PEG^{CHEM} wurde nach **Protokoll 2** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E21**) sowie mittels FT-IR.

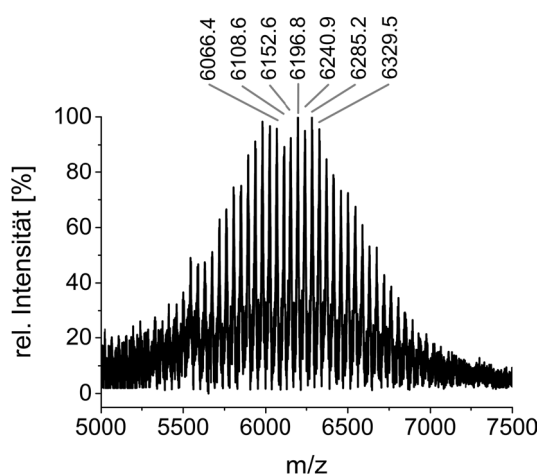
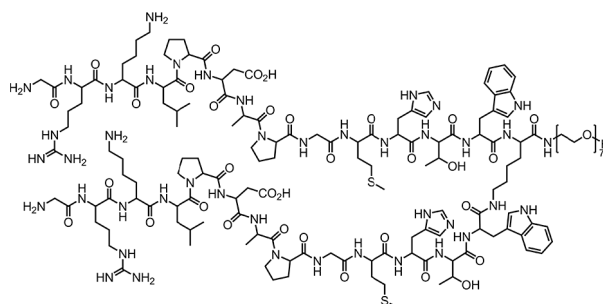


Abbildung E21. MALDI-ToF-MS-Spektrum von (G-TBP)₂-PEG.

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+Na]^+$ *ber.* 6195.2, *gef.* 6196.8; $\Delta M = 44$ m/z , charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEGn}} = 6172.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 74$).

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3289 (*b*), 2882 (*m*), 1654 (*m*), 1534 (*w*), 1456 (*w*), 1344 (*w*), 1280 (*vw*), 1241 (*vw*), 1180 (*vw*), 1101 (*s*), 956 (*w*), 841 (*w*).

5.5.14 (G-RKLPDAPGMHTW)₂K-BLOCK-PEG ((G-TBP)₂K-PEG^{CHEM})

(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM} wurde nach **Protokoll 3** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E22**) sowie mittels FT-IR.

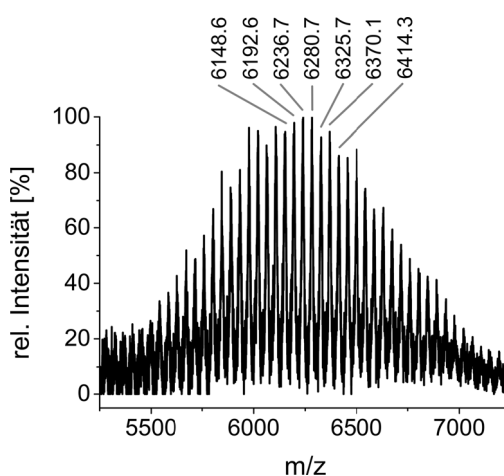
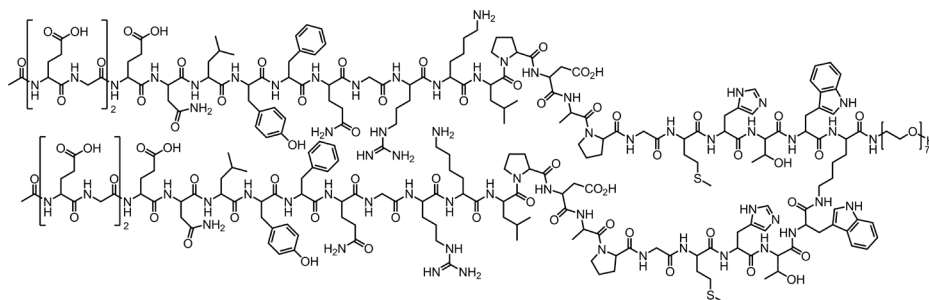


Abbildung E22. MALDI-ToF-MS-Spektrum von (G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}.

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+Na]^+$ *ber.* 6279.4, *gef.* 6280.7; $\Delta M = 44$ m/z , charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEGn}} = 6256.37$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 73$).

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3303 (*b*), 2881 (*m*), 1657 (*m*), 1532 (*w*), 1458 (*w*), 1381 (*w*), 1345 (*w*), 1281 (*w*), 1240 (*vw*), 1200 (*vw*), 1180 (*vw*), 1102 (*s*), 956 (*w*), 840 (*w*), 592 (*vw*), 463 (*vw*).

5.5.15 AC-(EG)₂-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW)₂K-BLOCK-PEG ((S4)₂K-PEG)

(S4)₂K-PEG wurde nach **Protokoll 3** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt und simultan vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte indirekt

mittels MALDI-ToF-MS nach CNBr-Spaltung der Methionin-Seitenkette des Peptidteils gemäß **Protokoll 7** (vgl. **Abbildung E23**) sowie mittels FT-IR.

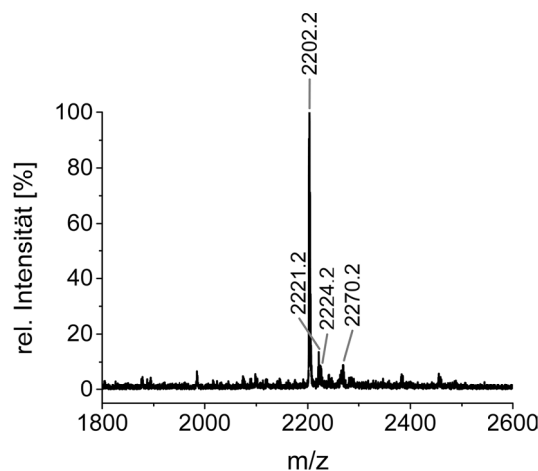
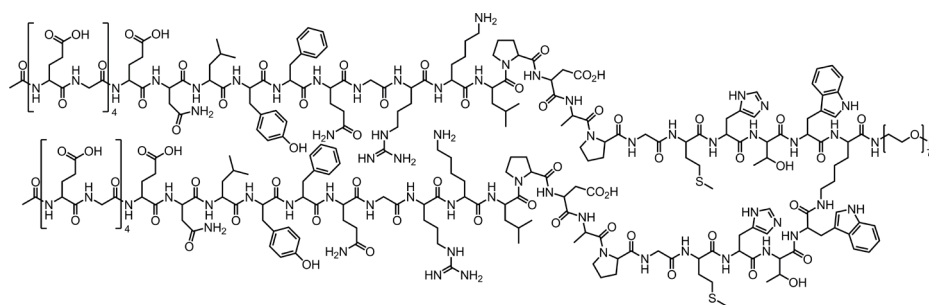


Abbildung E23. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **(S4)₂K-PEG** nach CNBr-Spaltung.

MALDI-ToF-MS (m/z): **HSL** [$C_{97}H_{144}N_{26}O_{33}$]: 2202.34 $g \cdot mol^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2203.3, *gef.* 2202.2; $[M+Na]^+$ *ber.* 2225.3, *gef.* 2224.2; **HS** [$C_{97}H_{146}N_{26}O_{34}$]: 2220.35 $g \cdot mol^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2221.4, *gef.* 2221.2; **HS^{FORM}** [$C_{98}H_{146}N_{26}O_{35}$]: 2248.36 $g \cdot mol^{-1}$, $[M+Na]^+$, *ber.* 2271.4, *gef.* 2270.2.

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3286 (*b*), 2872 (*m*), 1627 (*s*), 1522 (*m*), 1447 (*w*), 1350 (*vw*), 1298 (*vw*), 1246 (*vw*), 1200 (*vw*), 1091 (*m*), 948 (*w*), 837 (*vw*).

5.5.16 Ac-(EG)₄-ENLYFQG-RKLPDAPGMHTW)₂K-BLOCK-PEG ((S7)₄K-PEG)



(S7)₂K-PEG wurde nach **Protokoll 3** synthetisiert und nach **Protokoll 6** entschützt bzw. vom Harz abgespalten. Die Charakterisierung des Peptid-PEG-Konjugates erfolgte mittels FT-IR sowie indirekt mittels MALDI-ToF-MS (vgl. **Abbildung E24**) und analytischer UHPLC-MS nach CNBr-Spaltung der Methionin-Seitenkette des Peptidteils gemäß **Protokoll 7**.

FT-IR (ν [cm^{-1}]): 3288 (*b*), 2872 (*m*), 1630 (*s*), 1524 (*m*), 1447 (*w*), 1350 (*vw*), 1297 (*vw*), 1247 (*vw*), 1200 (*vw*), 1091 (*m*), 948 (*w*), 839 (*vw*).

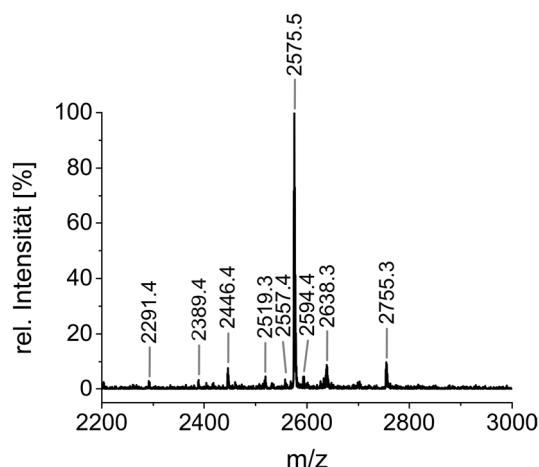


Abbildung E24. MALDI-ToF-MS-Spektrum von (S7)₂K-PEG nach CNBr-Spaltung.

MALDI-ToF-MS (m/z): **HSL** [$C_{111}H_{164}N_{30}O_{41}$]: $2574.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2575.7, *gef.* 2575.5; **HS** [$C_{111}H_{166}N_{30}O_{42}$]: $2592.68 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2593.7, *gef.* 2594.4; $[M+2Na-H]^+$ *ber.* 2637.7, *gef.* 2638.3; **HSL[-E+*t*Bu+Pbf]** [$C_{123}H_{181}N_{29}O_{41}S$]: $2753.99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2755.0, *gef.* 2755.4; **HSL[-E]** [$C_{106}H_{157}N_{29}O_{38}$]: $2445.55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2446.6, *gef.* 2446.4; **HSL[-G]** [$C_{109}H_{161}N_{29}O_{40}$]: $2517.61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2518.6, *gef.* 2519.3, **HSL[-EG]** [$C_{104}H_{154}N_{28}O_{37}$]: $2388.50 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2389.5, *gef.* 2389.4; **HSL[-Ac-EN]** [$C_{100}H_{149}N_{27}O_{35}$]: $2289.41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2290.4, *gef.* 2291.4; **Asp^{CA}-HSL** [$C_{111}H_{162}N_{30}O_{40}$]: $2556.65 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $[M+H]^+$ *ber.* 2557.7, *gef.* 2557.4.

5.5.16.1 Reinheitsbestimmung durch CNBr-Spaltung

Die Reinheitsbestimmung des Peptid-PEG-Konjugates (S7)₂K-PEG erfolgte durch Identifizierung der Peptidfragmente nach CNBr-Spaltung gemäß **Protokoll 7** mittels analytischer UHPLC-MS (Gradient: 15 – 50 % B, 6 min, 210 nm). Die quantitative Auswertung des Verhältnisses der Signalflächen wurde mit Hilfe der Chromatographiedatensoftware Empower 3 der Firma Waters vorgenommen (vgl. **Abbildung E25**).

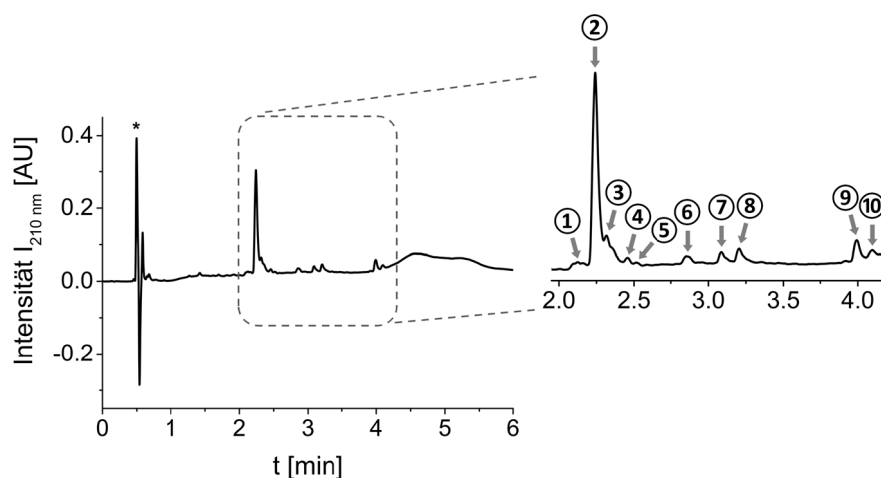


Abbildung E25. UHPLC-Chromatogramm von (S7)₂K-PEG nach CNBr-Spaltung zur Reinheitsbestimmung des Peptid-Polymer-Konjugates (Gradient: 15 – 50 % B, 6 min, 210 nm), * Injektionssignal.

UHPLC-MS (210 nm): $t_R = 2.24$ min (15 – 50 % B, 6 min), 67 % Reinheit.

Die Zuordnung der UV-Vis-Signale No. ① bis No. ⑩ zu den entsprechenden Spaltprodukten unter Angabe der jeweiligen Retentionszeiten kann **Tabelle E4** entnommen werden.

Tabelle E4. Zuordnung der UV-Vis-Signale No. ① bis No. ⑩ des UHPLC-Chromatogrammes von (S7)₂K-PEG nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E25**) zur Bestimmung der Reinheit des Peptid-Polymer-Konjugates unter Angabe der Retentionszeiten, der Signalfäche und der identifizierten Fragmente.

Signal No.	Retentionszeit t_R	Signalfäche	Identifizierte Fragmente
①	2.13 min	3 %	HS, HSL [+tBu], HSL [-Ac-E], Asp ^{HYDROLYSE} , Asp ^{HYDROLYSE} [-G]
②	2.24 min	67 %	HSL, HSL [-E]
③	2.32 min	14 %	HSL, HSL [-G], HSL [-EG], HSL [-(EG) ₂], HSL [-(EG) ₂ E]
④	2.46 min	2 %	Asp ^{IMID} -HSL, HSL [-E], HSL [-E ₂], HSL [-(EG) ₂ N], HSL [-(EG) ₃ G], HSL [-(EG) ₄]
⑤	2.51 min	1 %	HSL, HSL [-EG], HS [-(EG) ₃], HSL [-(EG) ₄ E]
⑥	2.85 min	2 %	HSL [-Ac-N], HSL [-Ac-EN], HSL [-(EG) ₄ EN], Asp ^{IMID} -HSL [-(EG) ₂ E]
⑦	3.08 min	2 %	HSL [-Ac-EN], HSL [-Ac-(EG) ₃ G]
⑧	3.20 min	3 %	HSL [-Ac-GEEN], HSL [-Ac-(EG) ₂ N]
⑨	3.99 min	5 %	HSL [-E+ t Bu+Pbf]
⑩	4.10 min	1 %	Zuordnung nicht möglich

Die ESI-MS-Spektren des UHPLC-Chromatogrammes von (S7)₂K-PEG nach der CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E25**) sind in den **Abbildungen E26-E30** zusammengestellt.

① ESI-MS (m/z): **HS** [C₁₁₁H₁₆₆N₃₀O₄₂]: 2592.68 g·mol⁻¹, [M+3H]³⁺ ber. 865.2, gef. 865.3; [M+2H+Na]³⁺ ber. 872.6, gef. 872.3; **HSL [+tBu]** [C₁₁₅H₁₇₂N₃₀O₄₁]: 2630.77 g·mol⁻¹; [M+4H]⁴⁺ ber. 658.7, gef. 658.6; **HSL [-Ac-E]** [C₁₀₄H₁₅₅N₂₉O₃₇]: 2403.52 g·mol⁻¹; [M+4H]⁴⁺ ber. 601.9, gef. 601.4; **Asp^{HYDROLYSE}** [C₉₇H₁₄₄N₂₆O₃₇]: 2266.33 g·mol⁻¹ [M+2H]²⁺ ber. 1134.2, gef. 1134.0; [M+3H]³⁺ ber. 756.5, gef. 756.0; **Asp^{HYDROLYSE} [-G]** [C₉₅H₁₄₁N₂₅O₃₆]: 2209.28 g·mol⁻¹ [M+3H]³⁺ ber. 737.4, gef. 737.8.

② ESI-MS (m/z): **HSL** [C₁₁₁H₁₆₄N₃₀O₄₁]: 2574.67 g·mol⁻¹, [M+3H]³⁺ ber. 859.2, gef. 859.3, [M+2H+Na]³⁺ ber. 866.6, gef. 866.6, [M+3H+K]⁴⁺ ber. 654.2, gef. 654.3; **HSL [-E]** [C₁₀₆H₁₅₇N₂₉O₃₈]: 2445.55 g·mol⁻¹, [M+3H]³⁺ ber. 816.2, gef. 816.2.

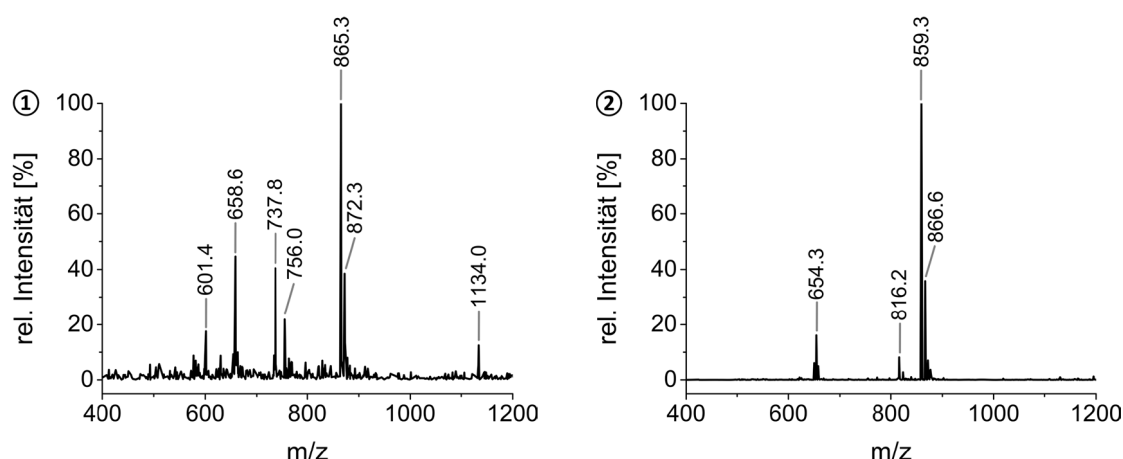


Abbildung E26. ESI-MS-Spektren der UV-Vis-Signale No. ① (links) und No. ② (rechts) des UHPLC-Chromatogrammes von (S7)zK-PEG nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E25**).

③ ESI-MS (m/z): **HSL** [$C_{111}H_{164}N_{30}O_{41}$]: 2574.67 g·mol⁻¹, $[M+3H]^{3+}$ ber. 859.2, gef. 859.3; $[M+H+2Na]^{3+}$ ber. 873.9, gef. 874.6; $[M+3Na]^{3+}$ ber. 881.2, gef. 881.8; $[M+3H+K]^{4+}$ ber. 654.2, gef. 654.1; $[M+4Na]^{4+}$ ber. 666.7, gef. 665.6; **HSL [-G]** [$C_{109}H_{161}N_{29}O_{40}$]: 2517.61 g·mol⁻¹, $[M+3H]^{3+}$ ber. 840.2, gef. 840.3; $[M+2Na+K]^{3+}$ ber. 867.6, gef. 867.8; **HSL [-EG]** [$C_{104}H_{154}N_{28}O_{37}$]: 2388.50 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1195.3, gef. 1194.9; $[M+3H]^{3+}$ ber. 797.2, gef. 797.2; **HSL [- (EG)₂]** [$C_{97}H_{144}N_{26}O_{33}$]: 2202.34 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1102.2, gef. 1102.5; $[M+3H]^{3+}$ ber. 735.1, gef. 735.0; $[M+3H+K]^{4+}$ ber. 561.1, gef. 561.0; **HSL [- (EG)₂E]** [$C_{92}H_{137}N_{25}O_{30}$]: 2073.22 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1037.6, gef. 1037.4; $[M+3H]^{3+}$ ber. 692.1, gef. 692.0; $[M+3H+K]^{4+}$ ber. 528.8, gef. 528.7.

④ ESI-MS (m/z): **Asp^{IMID}-HSL** [$C_{111}H_{162}N_{30}O_{40}$]: 2556.65 g·mol⁻¹, $[M+3H]^{3+}$ ber. 853.2, gef. 853.7; $[M+H+2K]^{3+}$ ber. 878.6, gef. 878.3; $[M+4H]^{4+}$ ber. 640.2, gef. 640.5; **HSL [-E]** [$C_{106}H_{157}N_{29}O_{38}$]: 2445.55 g·mol⁻¹, $[M+3H]^{3+}$ ber. 816.2, gef. 816.4; $[M+2H+Na]^{3+}$ ber. 823.5, gef. 823.7; $[M+3H+K]^{4+}$ ber. 621.9, gef. 621.8; **HSL [-E₂]** [$C_{101}H_{150}N_{28}O_{35}$]: 2316.44 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1159.2, gef. 1160.3; $[M+3H]^{3+}$ ber. 773.2, gef. 773.4; $[M+H+2Na]^{3+}$ ber. 787.8, gef. 788.2; **HSL [- (EG)₂N]** [$C_{93}H_{138}N_{24}O_{31}$]: 2088.23 g·mol⁻¹, $[M+3H]^{3+}$ ber. 697.1, gef. 696.8; $[M+H+3K]^{4+}$ ber. 551.6, gef. 552.3; **HSL [- (EG)₃G]** [$C_{86}H_{131}N_{23}O_{28}$]: 1959.12 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 980.6, gef. 980.2; $[M+3H]^{3+}$ ber. 654.1, gef. 654.0; $[M+H+2Na]^{3+}$ ber. 668.7, gef. 668.0; **HSL [- (EG)₄]** [$C_{83}H_{124}N_{22}O_{25}$]: 1830.01 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 916.0, gef. 916.2; $[M+3H]^{3+}$ ber. 611.0, gef. 611.1; $[M+3H+K]^{4+}$ ber. 468.0, gef. 468.1.

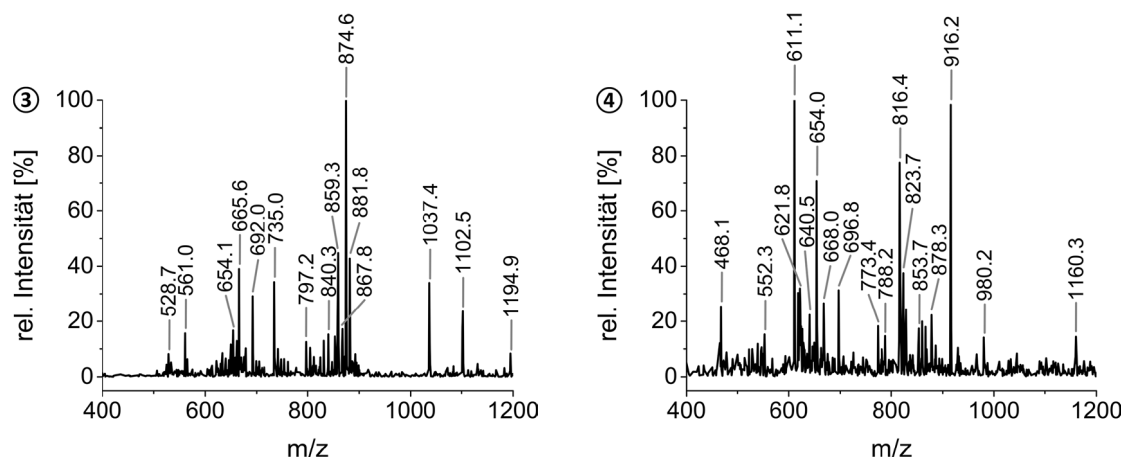


Abbildung E27. ESI-MS-Spektren der UV-Vis-Signale No. ③ (links) und No. ④ (rechts) des UHPLC-Chromatogrammes von (S7)₂K-PEG nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E25**).

⑤ ESI-MS (m/z): **HSL** [$C_{111}H_{164}N_{30}O_{41}$]: 2574.67 g·mol⁻¹, $[M+H+2K]^{3+}$ ber. 884.6, gef. 884.2; **HSL** [–EG] [$C_{104}H_{154}N_{28}O_{37}$]: 2388.50 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1195.3, gef. 1195.1; **HS** [–(EG)₃] [$C_{90}H_{136}N_{24}O_{30}$]: 2034.19 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1029.1, gef. 1029.4; **HSL** [–(EG)₄E] [$C_{78}H_{117}N_{21}O_{22}$]: 1700.89 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 851.5, gef. 851.4; $[M+H+Na]^{2+}$ ber. 862.4, gef. 862.7; $[M+2Na]^{2+}$ ber. 873.4, gef. 873.8; $[M+3H]^{3+}$ ber. 568.0, gef. 567.9; $[M+2H+K]^{3+}$ ber. 580.7, gef. 580.6; $[M+4H]^{4+}$ ber. 435.8, gef. 435.6.

⑥ ESI-MS (m/z): **HSL** [–Ac-N] [$C_{105}H_{156}N_{28}O_{38}$]: 2418.53 g·mol⁻¹, $[M+3H]^{3+}$ ber. 807.2, gef. 807.3; $[M+2H+Na]^{3+}$ ber. 814.5, gef. 814.4; $[M+2H+K]^{3+}$ ber. 819.9, gef. 820.5; $[M+5H+Na]^{6+}$ ber. 407.8, gef. 407.5; **HSL** [–Ac-EN] [$C_{100}H_{149}N_{27}O_{35}$]: 2289.41 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1145.7, gef. 1145.6; $[M+3H]^{3+}$ ber. 764.2, gef. 763.9; $[M+H+4Na]^{5+}$ ber. 476.5, gef. 477.1; **Asp**^{IMID}-**HSL** [–(EG)₂E] [$C_{92}H_{135}N_{25}O_{29}$]: 2055.21 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1028.6, gef. 1027.5; $[M+4H]^{4+}$ ber. 514.8, gef. 514.1; $[M+H+3K]^{4+}$ ber. 543.4, gef. 543.2; **HSL** [–(EG)₄EN] [$C_{74}H_{111}N_{19}O_{20}$]: 1586.79 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 794.4, gef. 794.8; $[M+3H]^{3+}$ ber. 529.9, gef. 530.3.

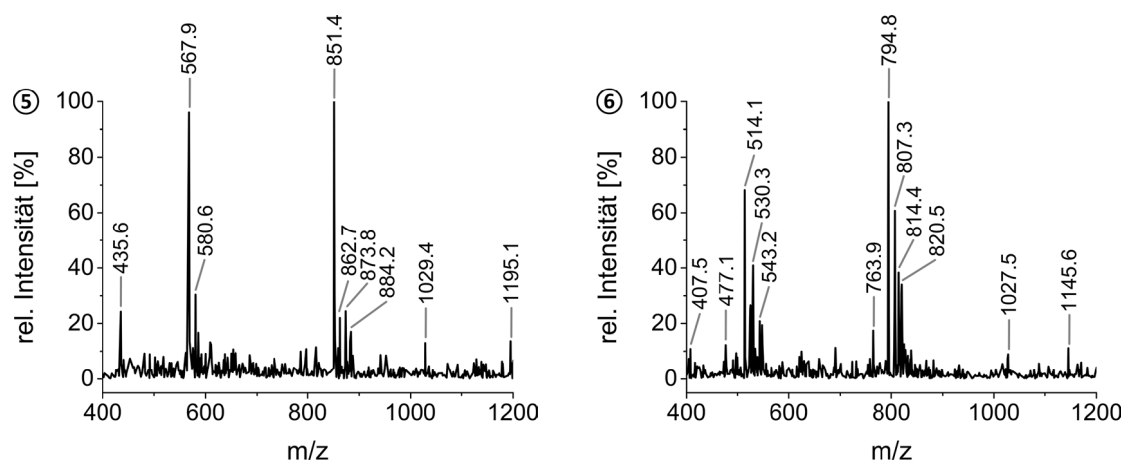


Abbildung E28. ESI-MS-Spektren der UV-Vis-Signale No. ⑤ (links) und No. ⑥ (rechts) des UHPLC-Chromatogrammes von (S7)₂K-PEG nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E25**).

⑦ ESI-MS (m/z): **HSL** [–Ac-EN] [$C_{100}H_{149}N_{27}O_{35}$]: 2289.41 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1145.7, gef. 1146.0; $[M+H+Na]^{2+}$ ber. 1156.7, gef. 1156.9; $[M+3H]^{3+}$ ber. 764.2, gef. 764.4; $[M+2H+Na]^{3+}$ ber. 771.5,

gef. 772.1; $[M+2H+K]^{3+}$ ber. 776.8, gef. 776.6; $[M+2H+2Na]^{4+}$ ber. 584.3, gef. 584.6; **HSL** $[-Ac-(EG)_3G]$ $[C_{86}H_{129}N_{23}O_{27}]$: 1917.08 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 959.6, gef. 959.6; $[M+5H]^{5+}$ ber. 480.3, gef. 480.5.

⑧ ESI-MS (m/z): **HSL** $[-Ac-GEGN]$ $[C_{96}H_{143}N_{25}O_{33}]$: 2175.31 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1088.7, gef. 1089.0; $[M+H+Na]^{2+}$ ber. 1099.7, gef. 1099.6; $[M+3H]^{3+}$ ber. 726.1, gef. 726.6; $[M+2H+K]^{3+}$ ber. 738.8, gef. 739.1; **HSL** $[-Ac-(EG)_2N]$ $[C_{91}H_{136}N_{24}O_{30}]$: 2046.20 g·mol⁻¹, $[M+2H]^{2+}$ ber. 1024.1, gef. 1024.8; $[M+2H+K]^{3+}$ ber. 695.8, gef. 695.9.

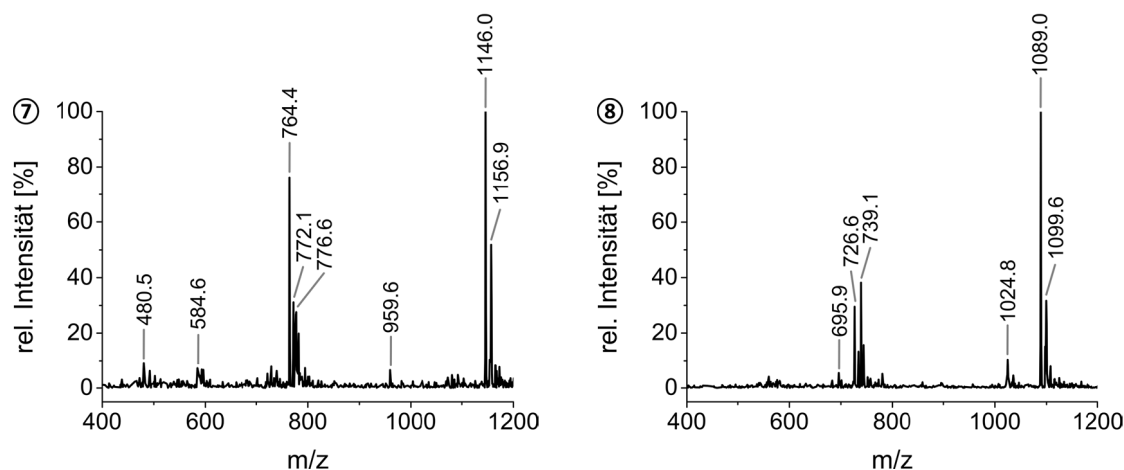


Abbildung E29. ESI-MS-Spektren der UV-Vis-Signale No. ⑦ (links) und No. ⑧ (rechts) des UHPLC-Chromatogrammes von (S7)₂K-PEG nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E25**).

⑨ ESI-MS (m/z): **HSL** $[-E+tBu+Pbf]$ $[C_{123}H_{181}N_{29}O_{41}S]$: 2753.99 g·mol⁻¹, $[M+3H]^{3+}$ ber. 919.0, gef. 919.3; $[M+2H+Na]^{3+}$ ber. 926.3, gef. 926.6; $[M+4H]^{4+}$ ber. 699.0, gef. 699.4.

⑩ Die Massensignale im ESI-MS-Spektrum konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Aufgrund der verzögerten Retentionszeit bei 4.10 min im Vergleich zu der des UV-Vis-Signals No. ② bei 2.24 min, welches der vollständigen Peptidsequenz **HSL** als Hauptfragment zugeordnet werden konnte, werden die detektierten Spezies als Verunreinigungen betrachtet.

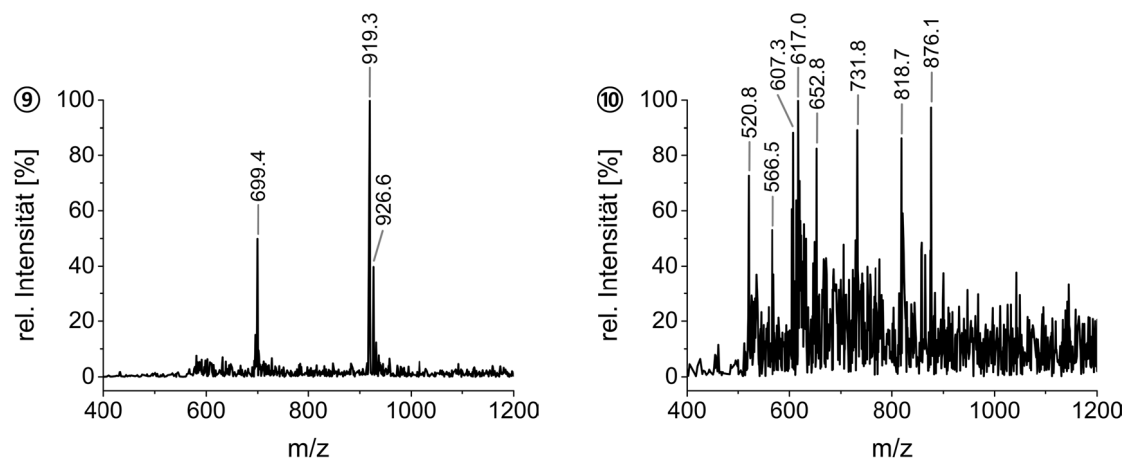


Abbildung E30. ESI-MS-Spektren der UV-Vis-Signale No. ⑨ (links) und No. ⑩ (rechts) des UHPLC-Chromatogrammes von (S7)₂K-PEG nach CNBr-Spaltung (vgl. **Abbildung E25**).

5.6 Enzymatische Aktivierung von Peptid-PEG-Konjugaten

Die enzymatische Aktivierung der Peptid-PEG-Konjugate erfolgte mittels der rekombinant exprimierten TEV Protease (*Roboklon*) unter Anwendung eines an Hand der Herstellervorschrift modifizierten Protokolls. Dafür wurde eine Stammlösung des jeweiligen Peptid-PEG-Konjugates in MQH₂O hergestellt und eine definierte Menge der Verbindung in einem Mikrozentrifugenröhrchen vorgelegt. Anschließend wurde der Ansatz entsprechend des Gesamtvolumens mit MQH₂O aufgefüllt und der 10× TEV Puffer hinzugefügt, um die eigentlichen Proteolysebedingungen zu erhalten (Protease-Puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME). Den Beginn einer Enzymreaktion markierte die Zugabe der TEV Protease, welche bei einer Temperatur 30 °C und einer Drehzahl von 600 min⁻¹ durchgeführt wurde. Der Substratumsatz wurde mittels analytischer RP-HPLC an Hand der Zunahme des isolierten UV-Vis-Signals der enzymatisch abgetrennten Suppressionsdomäne IF quantitativ bestimmt.

5.6.1 ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG VON S4-PEG

Das modifizierte Protokoll zur enzymatischen Aktivierung von **S4-PEG** mittels TEV Protease kann **Tabelle E5** entnommen werden. Die spezifische Aktivität der verwendeten Enzymcharge wurde durch den Hersteller auf 5 Units·μL⁻¹ (Enzymcharge #1) angegeben. Für die enzymkinetischen Untersuchungen und die QCM-D-Messungen wurde die Ansatzgröße entsprechend hochskaliert. Die Quantifizierung des Substratumsatzes von **S4-PEG** an Hand der abgetrennten Suppressionsdomäne **IF4^{ENZ}** sowie die Aufnahme einer Kalibriergerade für das synthetische Analogon **IF4^{CHEM}** erfolgte mittels analytischer RP-HPLC (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 20 % B, 2.0 – 15.0 min: 20 – 65 % B, 210 nm). Die durch die gemittelten Werte der dreifach bestimmten Signalfächen von **IF4^{ENZ}** berechnete Produktkonzentration wurde auf die 87 %ige Reinheit des Substrates **S4-PEG** normiert (vgl. **Kapitel 5.5.9.1** Seite 126).

Tabelle E5. Protokoll zur enzymatischen Aktivierung von **S4-PEG** durch die TEV Protease.

		Protokoll S4-PEG
Molekulargewicht		5669.49 g·mol ⁻¹
Substanzmenge		0.50-1.50 mg
TEV Protease <i>Enzymcharge #1</i>	spezifische Aktivität	5 Units·μL ⁻¹
	Konzentration	56 Units: 11.1 μL, 28 Units: 5.56 μL
10× TEV Puffer		61.7 μL
Gesamtvolumen		617.3 μL

5.6.1.1 Inhibierung der TEV Protease-Aktivität der Enzymcharge #1

Für die Bestimmung des Substratumsatzes zu einem festgelegten Zeitpunkt wurde der ProteolyseLösung eine Probe von 100.0 μL entnommen und der Aktivierungsvorgang durch Zugabe von 100.0 μL einer 10 mM Iodacetamid-Lösung in MQH₂O inhibiert.

Zur Überprüfung der Effektivität des Proteaseinhibitors gegenüber der katalytischen Aktivität der TEV Protease wurde die Ansatzgröße des modifizierten Protokolls (vgl. **Tabelle E5**) auf ein Gesamtvolumen von 154.3 μL herunterskaliert (0.25 mg **S4-PEG**). Dazu wurden 154.3 μL der 10 mM Iodacetamid-Lösung vor der Zugabe von 14 Units (2.8 μL) der Enzymcharge #1 der TEV Protease hinzugefügt. Anschließend wurde die Referenzlösung für einen Zeitraum von 4 h bei einer Temperatur 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} geschüttelt. Danach wurde der Ansatz auf noch verbleibende Enzymaktivität geprüft. Die Entstehung des Proteolyseproduktes **IF4^{ENZ}** konnte mittels analytischer RP-HPLC nicht nachgewiesen werden (vgl. **Abbildung E31**).

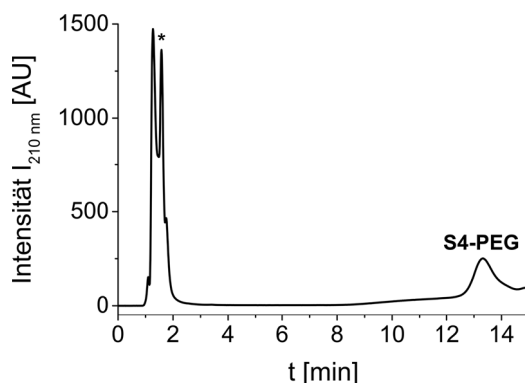


Abbildung E31. HPLC-Chromatogramm zum Nachweis der inhibierten Enzymaktivität der TEV Protease gegenüber **S4-PEG** durch Iodacetamid (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 20 % B, 2.0 – 15.0 min: 20 – 65 % B, 210 nm). * Überlagerte UV-Vis-Signale des Protease-Puffers und Iodacetamid. Bedingungen Proteolyse: 0.25 mg **S4-PEG**, 14 Units TEV Protease, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 30 °C, 4 h. Inhibierung: 10 mM Iodacetamid in MQH₂O.

5.6.1.2 Identifizierung der Proteolyseprodukte **G-TBP-PEG^{ENZ}** und **IF4^{ENZ}**

Die Proteolyseprodukte **G-TBP-PEG^{ENZ}** und **IF4^{ENZ}** der enzymatischen Aktivierung von **S4-PEG** konnten mittels MALDI-ToF-MS identifiziert werden (vgl. **Abbildung E32**).

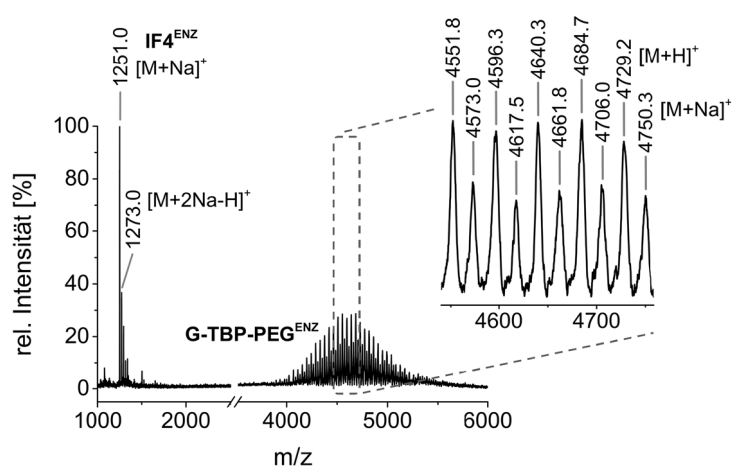


Abbildung E32. MALDI-ToF-MS-Spektrum der enzymatischen Aktivierung von **S4-PEG** zur Identifizierung der Proteolyseprodukte **G-TBP-PEG^{ENZ}** und **IF4^{ENZ}**. Bedingungen Proteolyse: 1.00 mg **S4-PEG**, 28 Units TEV Protease, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 30 °C, 16 h. Inhibierung: 10 mM Iodacetamid in MQH₂O.

MALDI-ToF-MS (m/z): **IF4^{ENZ}** [$C_{54}H_{74}N_{12}O_{21}$]: 1227.24 $g \cdot mol^{-1}$, $[M+Na]^+$ ber. 1250.2, gef. 1251.0; $[M+2Na-H]^+$ ber. 1272.2, gef. 1273.0; **G-TBP-PEG^{ENZ}**: $[M+H]^+$ ($n = 73$) ber. 4681.5, gef. 4684.7; $[M+Na]^+$ ($n = 73$) ber. 4703.5, gef. 4706.0; $\Delta M = 44$ m/z , charakteristisch für Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten; $M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEGn}} = 4680.5$ $g \cdot mol^{-1}$ ($n = 73$).

5.6.1.3 Quantifizierung und Kalibrierung

An Hand analytischer RP-HPLC-Messungen konnte die Entstehung von **IF4^{ENZ}** zeitlich verfolgt werden. Die Isolierung des UV-Vis-Signals der abgetrennten Suppressionsdomäne ermöglichte aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen Signalfäche und Konzentration die indirekte Quantifizierung des Substratumsatzes von **S4-PEG**. Zur Kalibrierung diente die synthetische Referenz **IF4^{CHEM}**. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen des Peptides zwischen 0.01 $mg \cdot mL^{-1}$ und 0.50 $mg \cdot mL^{-1}$ in Protease-Puffer in Gegenwart von 5 mM Iodacetamid mittels analytischer RP-HPLC dreifach vermessen. Zur Bestimmung der entsprechenden Signalfächen diente das Analyse- und Darstellungsprogramm OriginPro 9.1G (OriginLab Corporation, Northampton [MA], USA). In **Abbildung E33** sind die gemittelten Signalfächen der Kalibrierungslösungen in Abhängigkeit von der Konzentration des synthetischen Analogons **IF4^{CHEM}** aufgetragen. Durch das Anlegen einer linearen Ausgleichgerade konnte einen Anstieg von $490 \cdot 10^3 \pm 1 \cdot 10^3$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.99992$ ermittelt werden.

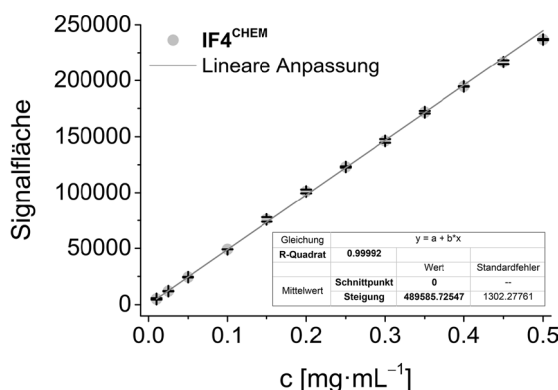


Abbildung E33. Auftragung der mittels analytischer RP-HPLC bestimmten Signalfächen der synthetischen Referenz **IF4^{CHEM}** in Abhängigkeit von der Konzentration (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 20 % B, 2.0 – 15.0 min: 20 – 65 % B, 210 nm). Kalibrierung: 0.01 – 0.50 $mg \cdot mL^{-1}$ **IF4^{CHEM}**, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 5 mM Iodacetamid.

5.6.2 ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG VON (S7)₂K-PEG

Das modifizierte Protokoll zur enzymatischen Aktivierung von **(S7)₂K-PEG** mittels TEV Protease kann **Tabelle E6** entnommen werden. Die spezifische Aktivität der verwendeten Enzymcharge wurde durch den Hersteller auf 10 Units μL^{-1} (Enzymcharge #2) angegeben. Für die enzymkinetischen Untersuchungen und die QCM-D-Messungen wurde die Ansatzgröße entsprechend hochskaliert. Die Quantifizierung der Substratumsatzes von **(S7)₂K-PEG** an Hand der abgetrennten Suppressionsdomäne **IF7^{ENZ}** sowie die Aufnahme einer Kalibriergerade für das synthetische Analogon **IF7^{CHEM}** erfolgte mittels analytischer RP-HPLC (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 17.5 % B, 2.0 – 15.0 min: 17.5 – 80 % B, 210 nm). Die durch die gemittelten Werte der dreifach

bestimmten Signalflächen von **IF7^{ENZ}** berechnete Produktkonzentration wurde auf die 67 %ige Reinheit des Substrates **(S7)₂K-PEG** normiert (vgl. **Kapitel 5.5.16.1** Seite 135).

Tabelle E6. Protokoll zur enzymatischen Aktivierung von **(S7)₂K-PEG** durch die TEV Protease.

		Protokoll (S7)₂K-PEG
Molekulargewicht		9419.46 g·mol ⁻¹
Substanzmenge		0.50-1.50 mg
TEV Protease	spezifische Aktivität	10 Units·μL ⁻¹
Enzymcharge #2	Konzentration	56 Units: 5.56 μL
10× TEV Puffer		61.7 μL
Gesamtvolumen		617.3 μL

5.6.2.1 Inhibierung der TEV Protease-Aktivität der Enzymcharge #2

Für die Bestimmung des Substratumsatzes zu einem festgelegten Zeitpunkt wurde der Proteolyselösung eine Probe von 100 μL entnommen und der Aktivierungsvorgang durch Zugabe von 100 μL einer 10 mM Iodacetamid in MQH₂O versetzt mit 0.2 % HCOOH (v/v) inhibiert.

Zur Überprüfung der Effektivität des Proteaseinhibitors gegenüber der katalytischen Aktivität der TEV Protease wurde die Ansatzgröße des modifizierten Protokolls (vgl. **Tabelle E6**) auf ein Gesamtvolumen von 154.3 μL herunterskaliert (0.25 mg **(S7)₂K-PEG**). Dazu wurden 154.3 μL einer Lösung von 10 mM Iodacetamid vor der Zugabe von 14 Units (1.4 μL) der Enzymcharge #2 der TEV Protease hinzugefügt. Anschließend wurde die Referenzlösung für einen Zeitraum von 4 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min⁻¹ geschüttelt. Danach wurde der Ansatz mittels analytischer RP-HPLC auf noch verbleibende Enzymaktivität geprüft. Die Entstehung des Proteolyseproduktes **IF7^{ENZ}** konnte dabei nicht nachgewiesen werden (vgl. **Abbildung E34**).

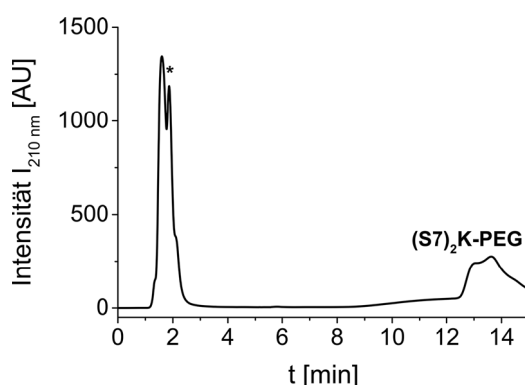


Abbildung E34. HPLC-Chromatogramm zum Nachweis der inhibierten Enzymaktivität der TEV Protease gegenüber **(S7)₂K-PEG** durch Iodacetamid (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 17.5 % B, 2.0 – 15.0 min: 17.5 – 80 % B, 210 nm). * Überlagerte UV-Vis-Signale des Protease-Puffers und Iodacetamid. Bedingungen Proteolyse: 0.25 mg **(S7)₂K-PEG**, 14 Units TEV Protease, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 30 °C, 4 h. Inhibierung: 10 mM Iodacetamid in MQH₂O mit 0.2 % HCOOH (v/v).

5.6.2.2 Identifizierung des Proteolyseproduktes **IF7^{ENZ}**

Das Proteolyseprodukt **IF7^{ENZ}** der enzymatischen Aktivierung von **(S7)₂K-PEG** konnte isoliert und nach Lyophilisation mittels analytischer UHPLC-MS (Gradient: 15 – 65 % B, 4 min, 210 nm) identifiziert werden (vgl. **Abbildung E35**). Ein direkter Nachweis des simultan gebildeten Peptid-PEG-Konjugates **(G-TBP)₂-PEG^{ENZ}** mittels MALDI-ToF-MS war nicht möglich. Die Reaktionskontrollen zeigten eine schwache Desorption in die Gasphase, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis und die Signalauflösung vermindert wurden. Höhermolekulare Biokonjugat-Strukturen mit verzweigten oder cyclischen Peptidketten tendieren im Vergleich zu linearen Analoga häufiger dazu Aggregate zu bilden, so dass die Verteilung der Substanz innerhalb Matrix inhomogen ist und die Ionisierung der Komponente beeinträchtigt wird.^[369]

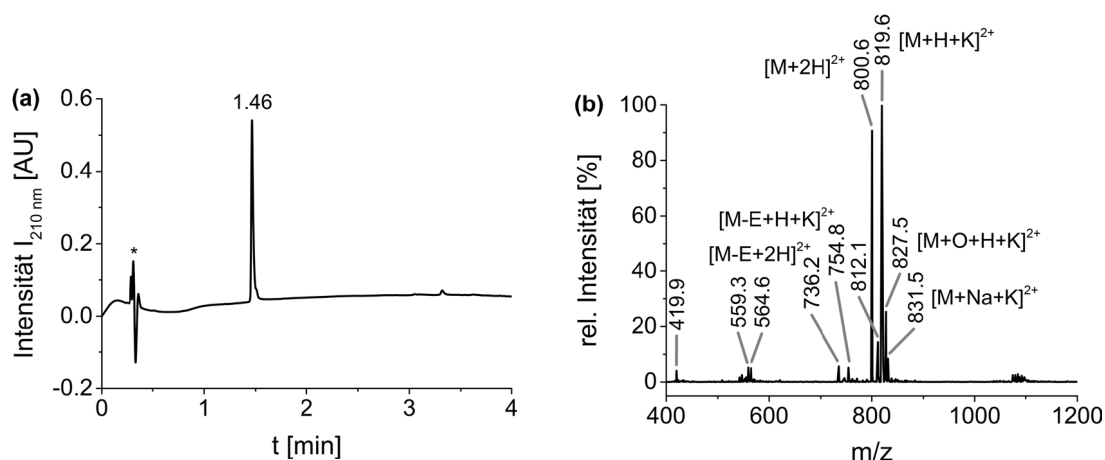


Abbildung E35. Identifizierung des Proteolyseproduktes **IF7^{ENZ}** der enzymatischen Aktivierung von **(S7)₂K-PEG**: UHPLC-Chromatogramm (Gradient: 15 – 65 % B, 4 min, 210 nm), * Injektionssignal (a). ESI-MS-Spektrum (b). Bedingungen Proteolyse: 1.00 mg **(S7)₂K-PEG**, 56 Units TEV Protease, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 30 °C, 16 h. Inhibierung: 10 mM Iodacetamid in MQH₂O mit 0.2 % HCOOH (v/v).

IF7^{ENZ} [C₆₈H₉₄N₁₆O₂₉]: 1599.56 g·mol⁻¹, UHPLC (210 nm): t_R = 1.46 min (15-65% B, 4 min), ESI-MS (m/z): [M+2H]²⁺ ber. 800.8, gef. 800.6; [M+H+Na]²⁺ ber. 811.8, gef. 812.1; [M+H+K]²⁺ ber. 819.8, gef. 819.6; [M+O+H+K]²⁺ ber. 827.8, gef. 827.5^a; [M+Na+K]²⁺ ber. 830.8, gef. 831.5; [M-E+2H]²⁺ ber. 736.2, gef. 736.2; [M-E+H+K]²⁺ ber. 755.3, gef. 754.8; [M+H+2K]³⁺ ber. 559.6, gef. 559.3; [M+O+H+2K]³⁺ ber. 564.9, gef. 564.6^a; [M+2H+2K]⁴⁺ ber. 419.9, gef. 419.9.

^a Durch den Ionisationsvorgang bei der Aufnahme eines ESI-MS-Spektrums kann es zur Oxidation der Tyrosin-Seitenkette der desorbierten Spezies kommen (M+O bzw. M+16 Da).^[380]

5.6.2.3 Quantifizierung und Kalibrierung

An Hand analytischer RP-HPLC-Messungen konnte die Entstehung von **IF7^{ENZ}** zeitlich verfolgt werden. Die Isolierung des UV-Vis-Signals der abgetrennten Suppressionsdomäne ermöglichte aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen Signalfäche und Konzentration die indirekte Quantifizierung des Substratumsatzes von **(S7)₂K-PEG**. Zur Kalibrierung diente die synthetische Referenz **IF7^{CHEM}**. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen des Peptides zwischen

0.03 mg·mL⁻¹ und 0.80 mg·mL⁻¹ in Protease-Puffer in Gegenwart von 5 mM Iodacetamid und 0.1 % HCOOH (v/v) mittels analytischer RP-HPLC dreifach vermessen. Zur Bestimmung der entsprechenden Signalflächen diente das Analyse- und Darstellungsprogramm OriginPro 9.1G (OriginLab Corporation). In **Abbildung E36** sind die gemittelten Signalflächen der Kalibrierungslösungen in Abhängigkeit von der Konzentration des synthetischen Analogons **IF7^{CHEM}** aufgetragen. Durch das Anlegen einer linearen Ausgleichsgerade konnte ein Anstieg von $387 \cdot 10^3 \pm 11 \cdot 10^3$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.99189$ ermittelt werden.

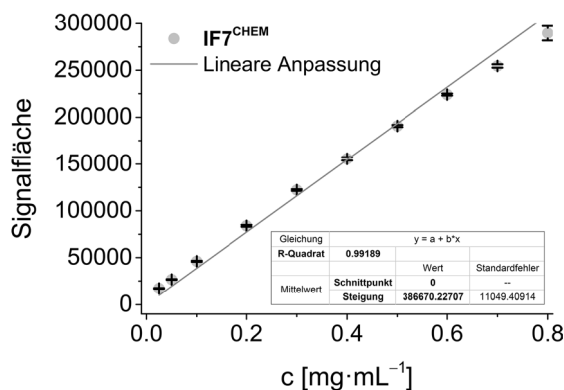


Abbildung E36. Auftragung der mittels analytischer RP-HPLC bestimmten Signalflächen der synthetischen Referenz **IF7^{CHEM}** in Abhängigkeit von der Konzentration (Gradient: 0.0 – 2.0 min: 17.5 % B, 2.0 – 15.0 min: 17.5 – 80 % B, 210 nm). Kalibrierung: 0.01 – 0.50 mg·mL⁻¹ **IF7^{CHEM}**, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME, 5 mM Iodacetamid, 0.1 % HCOOH (v/v).

5.7 QCM-D-Messungen

5.7.1 ADSORPTIONSVERHALTEN VON G-TBP-PEG^{CHEM}

Das Peptid-PEG-Konjugat **G-TBP-PEG^{CHEM}** wurde mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($11.2 \mu\text{M}$) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QX310 Ti) sind in **Abbildung E37** dargestellt.

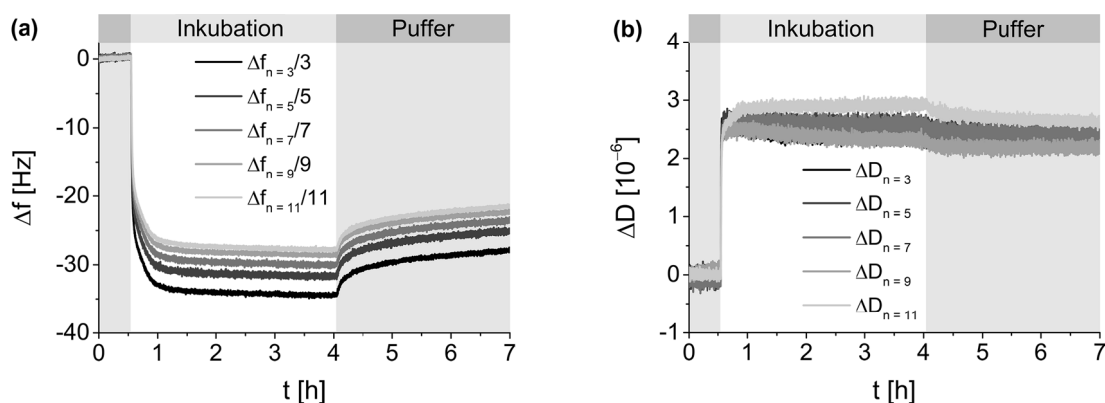


Abbildung E37. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation mit $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Biokonjugat-Lösung ($11.2 \mu\text{M}$ **G-TBP-PEG^{CHEM}**) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.2 ADSORPTIONSVERHALTEN VON EPITOP-TBP-PEG

Das Peptid-PEG-Konjugat **Epitop-TBP-PEG** wurde mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($9.3 \mu\text{M}$) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **Epitop-TBP-PEG** auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QX310 Ti) sind in **Abbildung E38** dargestellt.

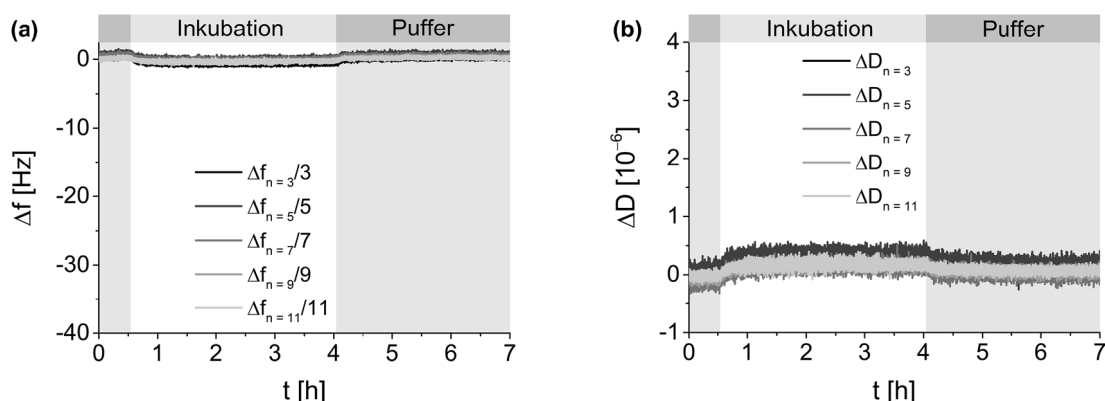


Abbildung E38. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **Epitop-TBP-PEG**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation mit $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Biokonjugat-Lösung ($9.3 \mu\text{M}$ **Epitop-TBP-PEG**) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.3 ADSORPTIONSVERHALTEN DER PEPTID-PEG-KONJUGATE S1-PEG BIS S6-PEG

Das Peptid-PEG-Konjugat **S1-PEG** wurde mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($9.1 \mu\text{M}$) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** vermessen. Für die Peptid-PEG-Konjugate **S2-PEG** ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $8.8 \mu\text{M}$) und **S3-PEG** ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $9.1 \mu\text{M}$) wurden die Messungen unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die entsprechenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen auf titanbeschichteten Sensorkristallen (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E39** dargestellt.

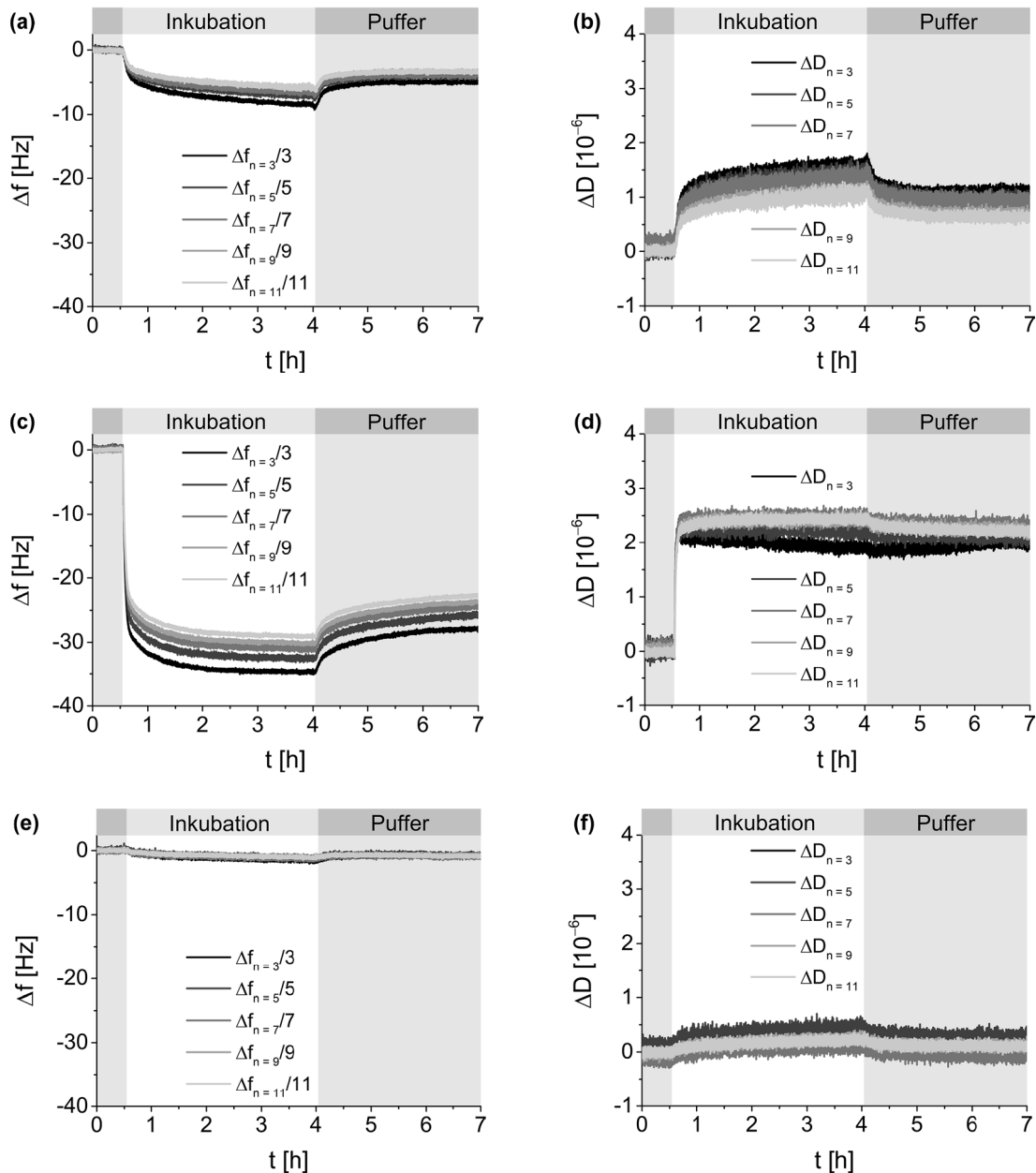


Abbildung E39. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der Peptid-PEG-Konjugate **S1-PEG**, **S2-PEG** und **S3-PEG**: **S1-PEG**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). **S2-PEG**: Frequenzänderungen (c) und Dissipationsänderungen (d). **S3-PEG**: Frequenzänderungen (e) und Dissipationsänderungen (f). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation mit $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ der jeweiligen Biokonjugat-Lösung ($9.1 \mu\text{M}$ **S1-PEG**; $8.8 \mu\text{M}$ **S2-PEG**; $9.1 \mu\text{M}$ **S3-PEG**) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

Für die Peptid-PEG-Konjugate **S4-PEG** ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $8.8 \mu\text{M}$), **S5-PEG** ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $8.4 \mu\text{M}$) und **S6-PEG** ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $9.1 \mu\text{M}$) wurden die Messungen unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die entsprechenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen auf titanbeschichteten Sensorkristallen (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E40** dargestellt.

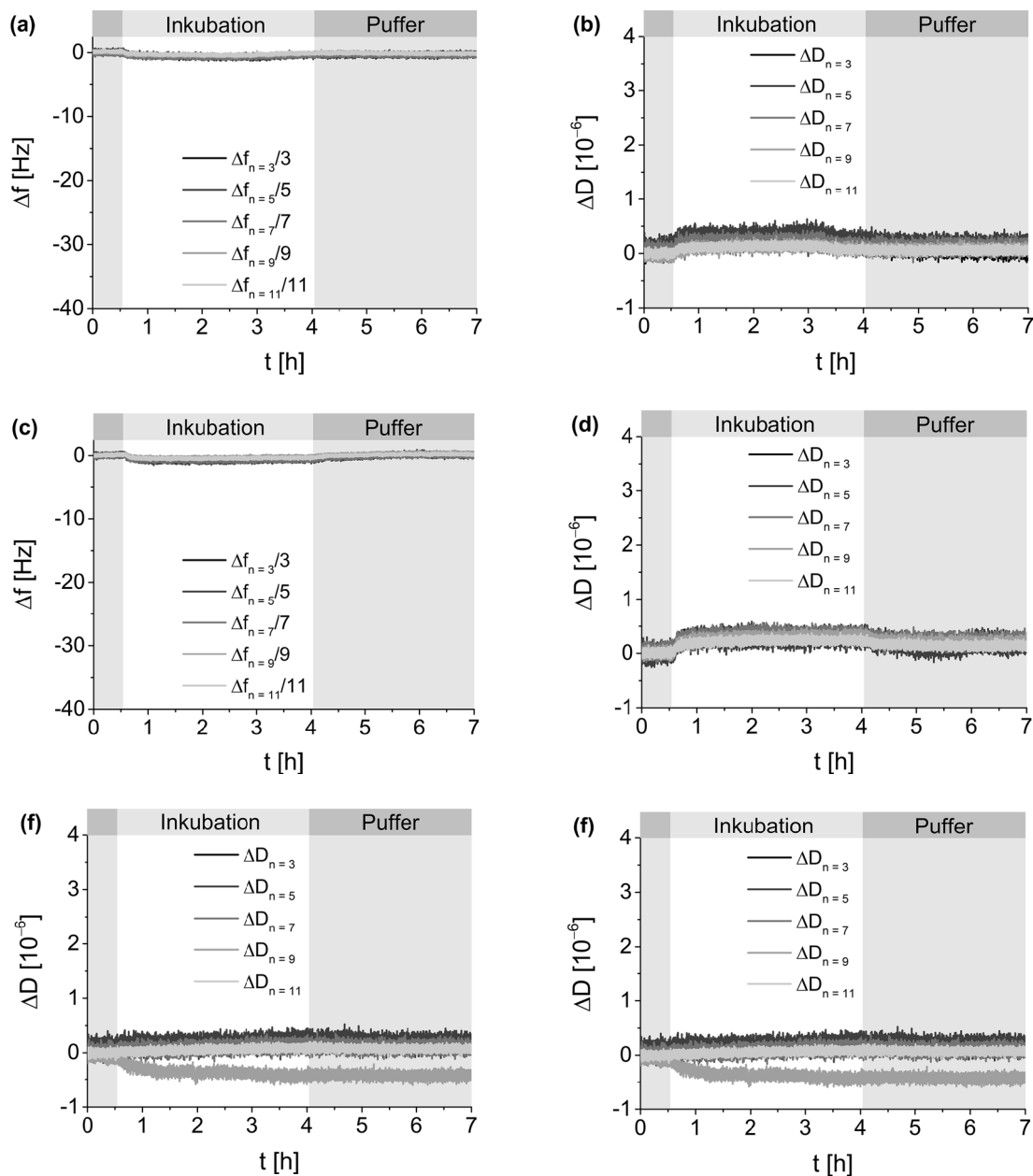


Abbildung E40. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der Peptid-PEG-Konjugate **S4-PEG**, **S5-PEG** und **S6-PEG**: **S4-PEG**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). **S5-PEG**: Frequenzänderungen (c) und Dissipationsänderungen (d). **S6-PEG**: Frequenzänderungen (e) und Dissipationsänderungen (f). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation mit $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ der jeweiligen Biokonjugat-Lösung ($8.8 \mu\text{M}$ **S4-PEG**; $8.9 \mu\text{M}$ **S5-PEG**; $8.4 \mu\text{M}$ **S6-PEG**) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.4 EXPERIMENTE ZUR ENZYMATISCHEN AKTIVIERUNG VON S4-PEG

5.7.4.1 Adsorptionsverhalten des enzymatisch aktivierten S4-PEG

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens des enzymatisch aktivierten S4-PEG wurde die Ansatzgröße des in **Tabelle E5** aufgeführten Protokolls (vgl. **Kapitel 5.6.1.1** Seite 140) auf ein Gesamtvolumen von 800.0 μL hochskaliert. Dazu wurden 1.30 mg (0.23 μM) S4-PEG in MQH₂O aufgenommen und 80.0 μL des 10 \times TEV Puffers hinzugefügt. Die Zugabe von 36 Units der Enzymcharge #1 der TEV Protease (spezifische Aktivität: 5 Units $\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 7.20 μL) markierte den Beginn der Enzymreaktion unter den Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME bei einer Temperatur von 30 °C. Nach einer Inkubationszeit von 16 h und einer Drehzahl von 600 min⁻¹ wurden 100.0 μL der Aktivierungslösung entnommen und die katalytische Aktivität des Enzyms durch die Zugabe von 100.0 μL einer 10 mM Lösung Iodacetamid in MQH₂O inhibiert. Der Substratumsatz wurde mittels analytischer HPLC nach einer Normierung entsprechend der in **Tabelle E3** angegebenen 87%igen Reinheit von S4-PEG (vgl. **Kapitel 5.5.16.1** Seite 127) auf 78 % bestimmt. Für die Messung wurde die verbleibende Aktivierungslösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf Konzentrationen von 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (7.7 μM) G-TBP-PEG^{ENZ} und 2 Units $\cdot\text{mL}^{-1}$ TEV Protease verdünnt und das Experiment nach **Protokoll 8** durchgeführt. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des enzymatisch aktivierten S4-PEG auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QX 310 Ti) sind in **Abbildung E41** dargestellt.

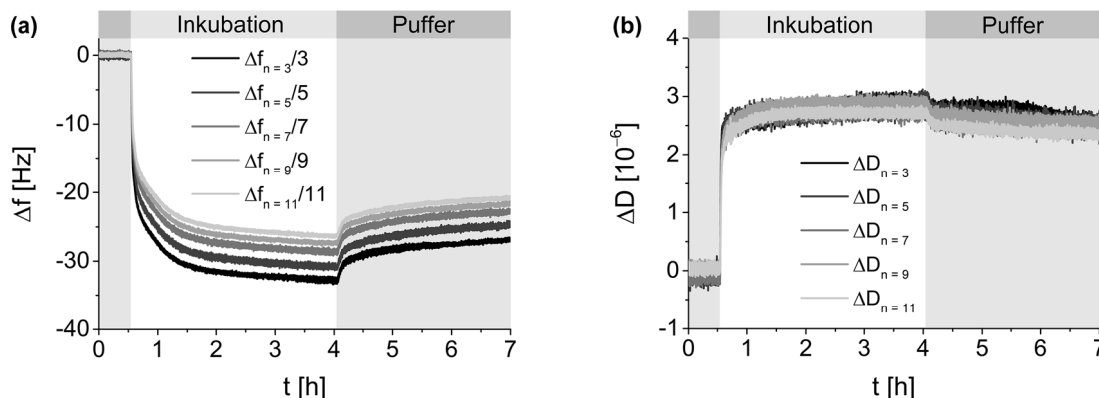


Abbildung E41. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des enzymatisch aktivierten S4-PEG: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der Aktivierungslösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (7.7 μM) G-TBP-PEG^{ENZ} und 2 Units $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ TEV Protease; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.4.2 Referenzexperiment: nicht-aktiviertes S4-PEG ohne TEV Protease

1.00 mg (0.18 μmol) S4-PEG wurden ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O aufgenommen und 61.7 μL des 10 \times TEV Puffers zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer

Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($11.2 \mu\text{M}$) **S4-PEG** verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des nicht-aktivierten **S4-PEG** auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E42** dargestellt.

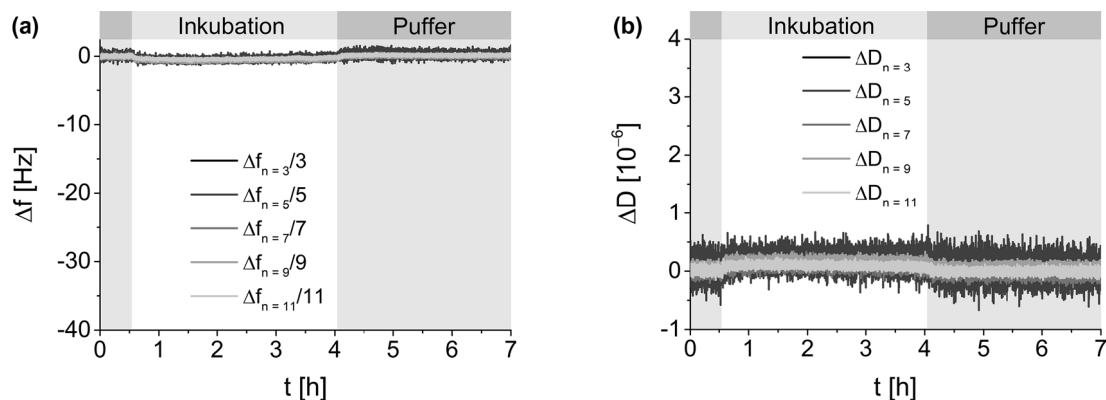


Abbildung E42. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des nicht-aktivierten **S4-PEG**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($11.2 \mu\text{M}$) **S4-PEG**; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.4.3 Referenzexperiment: **G-TBP-PEG^{CHEM}** ohne TEV Protease

0.79 mg ($0.18 \mu\text{mol}$) des synthetischen Analogons **G-TBP-PEG^{CHEM}** wurden ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O aufgenommen und $61.7 \mu\text{L}$ des 10× TEV Puffers zu einem Endvolumen von $617.3 \mu\text{L}$ hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30°C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($11.2 \mu\text{M}$) **G-TBP-PEG^{CHEM}** verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E43** dargestellt.

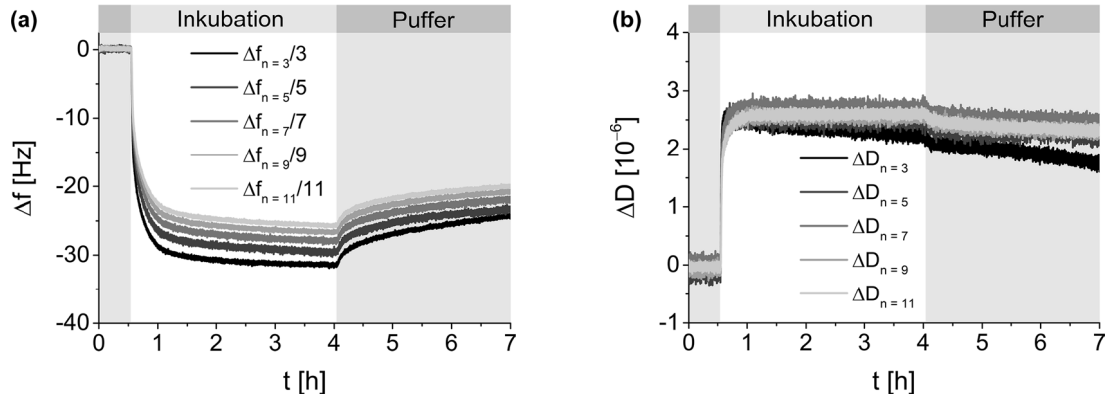


Abbildung E43. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der Aktivierungsreferenz **G-TBP-PEG^{CHEM}**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($11.2 \mu\text{M}$) **G-TBP-PEG^{CHEM}**; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.4.4 Referenzexperiment: Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}** ohne TEV Protease

0.22 mg ($0.18 \mu\text{mol}$) des synthetischen Analogons der Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}** wurden ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O aufgenommen und $61.7 \mu\text{L}$ des 10× TEV Puffers zu einem Endvolumen von $617.3 \mu\text{L}$ hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris·HCl, (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von $14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($11.2 \mu\text{M}$) **IF4^{CHEM}** verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen der Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}** auf einem titanbeschichteten Sensor-kristall (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E44** dargestellt.

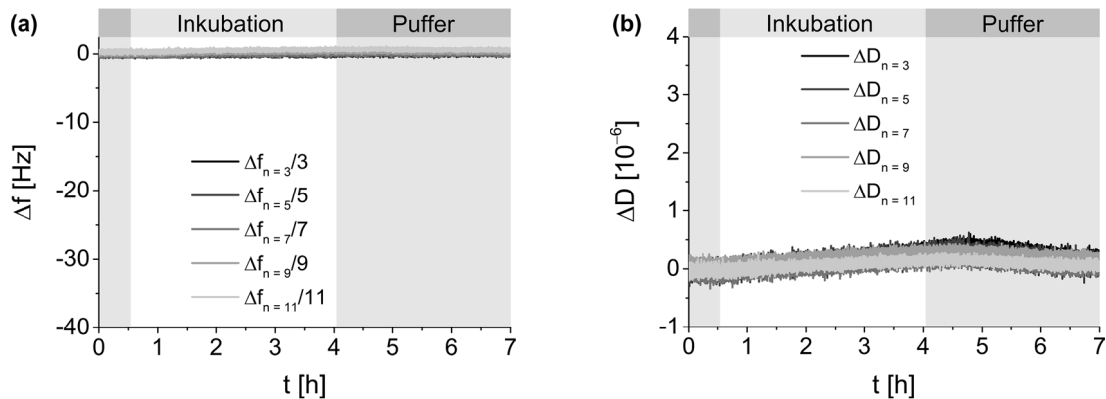


Abbildung E44. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des synthetischen Analogons der Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf $14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($11.2 \mu\text{M}$) **IF4^{CHEM}**; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.4.5 Referenzexperiment: artifizielle Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] ohne TEV Protease

Basierend auf dem mittels analytischer HPLC bestimmten Substratumsatz des enzymatisch aktivierten **S4-PEG** von 78 % (vgl. **Kapitel 5.7.4.1** Seite 149) wurde eine artifizielle Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] bestehend aus den synthetischen Analoga des Binders **G-TBP-PEG^{CHEM}** und der Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}** sowie des verbleibenden Eduktes **S4-PEG** in Protease-Puffer hergestellt. Dazu wurden 0.54 mg (0.12 μmol) **G-TBP-PEG^{CHEM}**, 0.15 mg (0.12 μmol) **IF4^{CHEM}** und 0.32 mg (0.06 μmol) des Substrates **S4-PEG** ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O aufgenommen und 61.7 μL des 10 \times TEV Puffers zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf Konzentrationen von 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (7.7 μM) **G-TBP-PEG^{CHEM}**, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (7.8 μM) **IF4^{CHEM}** sowie 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (3.6 μM) **S4-PEG** verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen der artifiziellen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %] auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (Qsx 310 Ti) sind in **Abbildung E45** dargestellt.

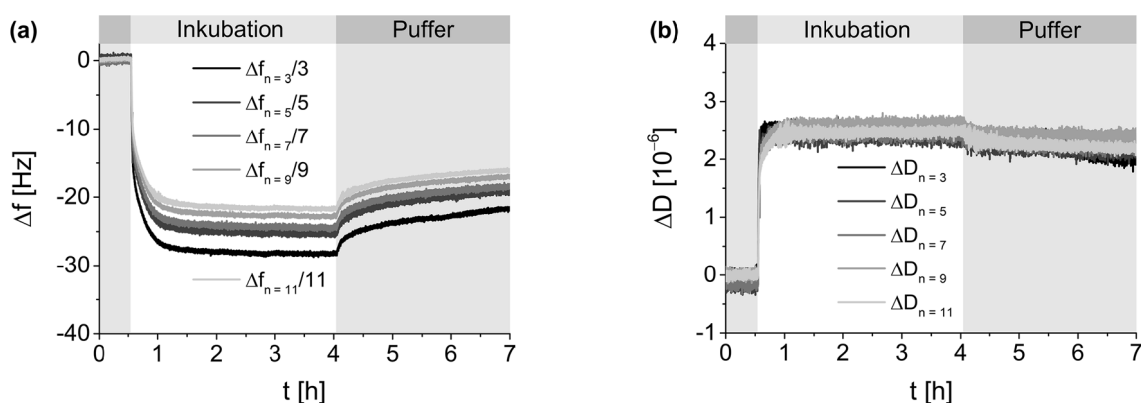


Abbildung E45. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der artifiziellen Referenz **REF1^{CHEM}** [78 %]: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (7.7 μM) **G-TBP-PEG^{CHEM}**, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (7.8 μM) **IF4^{CHEM}** und 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (3.6 μM) **S4-PEG**; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.4.6 Referenzexperiment: Protease-Puffer ohne TEV Protease

61.7 μL des 10 \times TEV Puffers wurden ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O auf ein Endvolumen von 617.3 μL verdünnt, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf Konzentrationen von 0.98 mM Tris-HCl, 5.89 mM NaCl, 0.55 mM 2ME verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Protease-Puffers auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (Qsx 310 Ti) sind in **Abbildung E46** dargestellt.

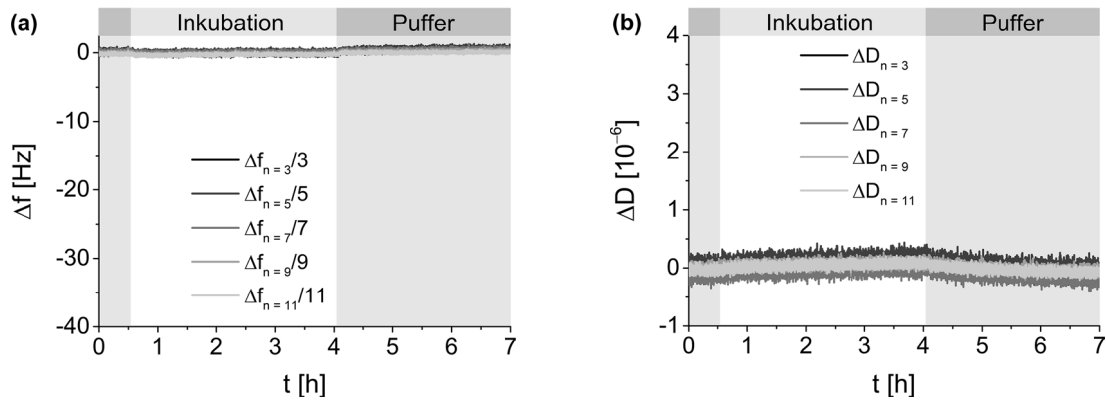


Abbildung E46. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Protease-Puffers: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 0.98 mM Tris-HCl, 5.89 mM NaCl, 0.55 mM 2ME; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.5 ENZYMABHÄNGIGES ADSORPTIONSVERHALTEN VON G-TBP-PEG^{CHEM} [100 %]

0.79 mg (0.18 μmol) **G-TBP-PEG^{CHEM}** wurden mit 28 Units (0.5 Äq., 5.56 μL), der Enzymcharge #1 der TEV Protease (spezifische Aktivität: 5 Units· μL^{-1}) in MQH₂O aufgenommen und 61.7 μL des 10× TEV Puffers zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min⁻¹ wurde die Referenzlösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (11.2 μM) **G-TBP-PEG^{CHEM}** mit 2 Units·mL⁻¹ TEV Protease verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart von 28 Units TEV Protease auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (Qsx 310 Ti) sind in **Abbildung E47** dargestellt.

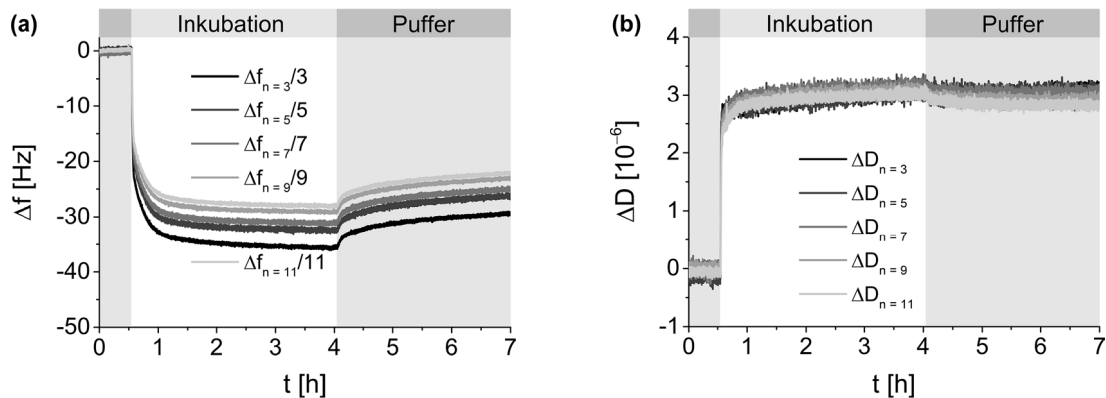


Abbildung E47. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart von 28 Units (0.5 Äq.) der Enzymcharge #1 der TEV Protease: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (11.2 μM) **G-TBP-PEG^{CHEM}** mit 2 Units· μL^{-1} TEV Protease; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

Für die Messungen in Gegenwart von 56 Units (1.0 Äq., 11.1 μL), 83 Units (1.5 Äq., 16.7 μL) bzw. 111 Units (2.0 Äq., 22.2 μL) TEV Protease wurden 0.79 mg (0.18 μmol) **G-TBP-PEG^{CHEM}** wie zuvor beschrieben behandelt. Anschließend wurde die jeweilige Referenzlösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf Konzentrationen von 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (11.2 μM) **G-TBP-PEG^{CHEM}** mit 4 Units $\cdot\text{mL}^{-1}$, 5 Units $\cdot\text{mL}^{-1}$ bzw. 7 Units $\cdot\text{mL}^{-1}$ TEV Protease verdünnt nach **Protokoll 8** vermessen. Die entsprechenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen auf titanbeschichteten Sensorkristallen (QSX 310 Ti) sind **Abbildung E48** dargestellt.

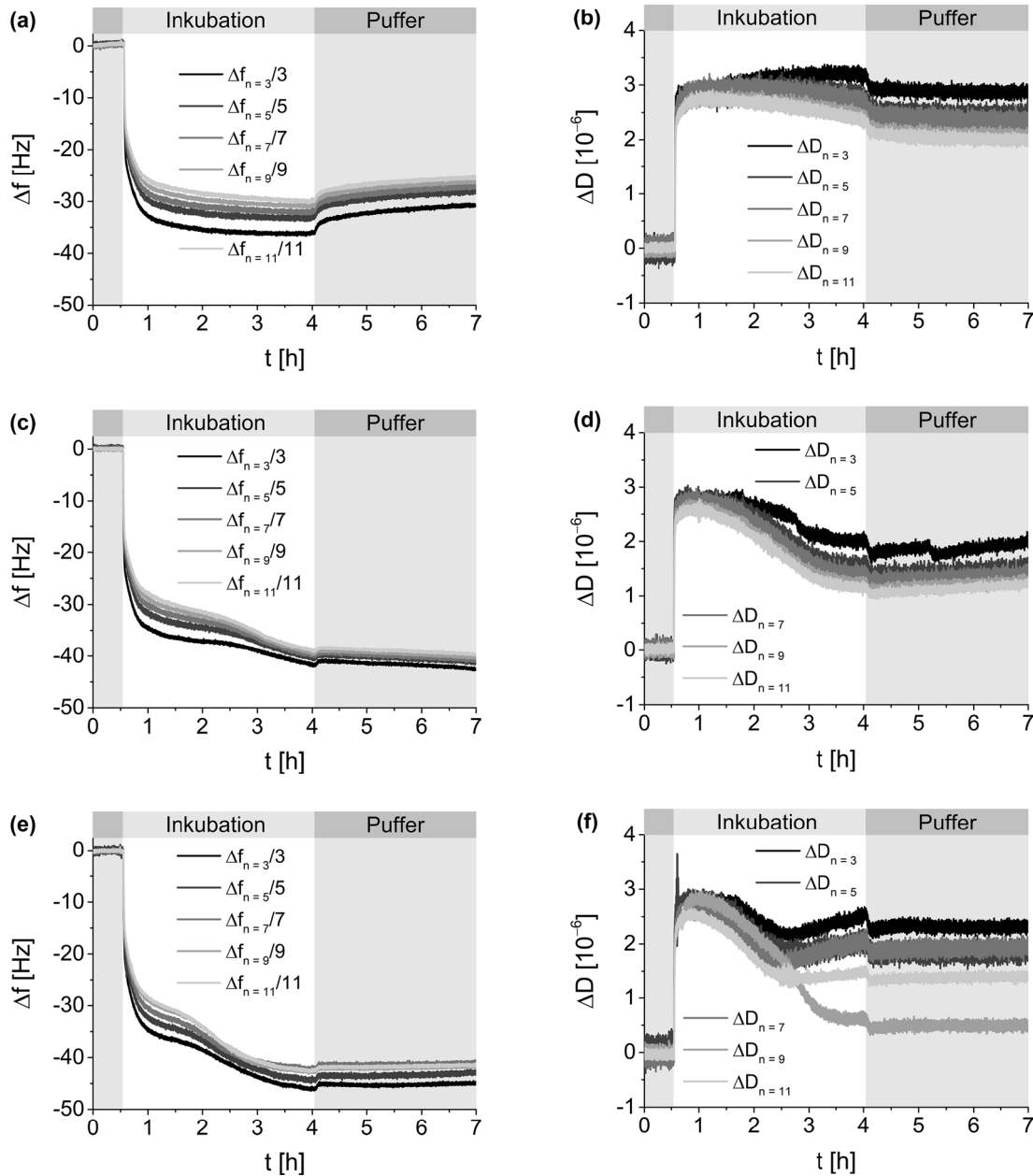


Abbildung E48. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** [100 %] in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Enzymcharge #1 der TEV Protease. 56 Units Enzym: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). 83 Units Enzym: Frequenzänderungen (c) und Dissipationsänderungen (d). 111 Units Enzym: Frequenzänderungen (e) und Dissipationsänderungen (f). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der jeweiligen Referenzlösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (11.2 μM) **G-TBP-PEG^{CHEM}** mit 4 Units $\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 5 Units $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ bzw. 7 Units $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ TEV Protease; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.6 ADSORPTIONSVERHALTEN DES LINEAREN DIMERES $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$ UND DES VERZWEIGTEN DIMERES $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$

Das lineare Dimer $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$ wurde mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($8.0 \mu\text{M}$) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** vermessen. Für das verzweigte Dimer $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $8.0 \mu\text{M}$) wurde die Messung unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die entsprechenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen auf titanbeschichteten Sensorkristallen (QX 310 Ti) sind **Abbildung E49** dargestellt.

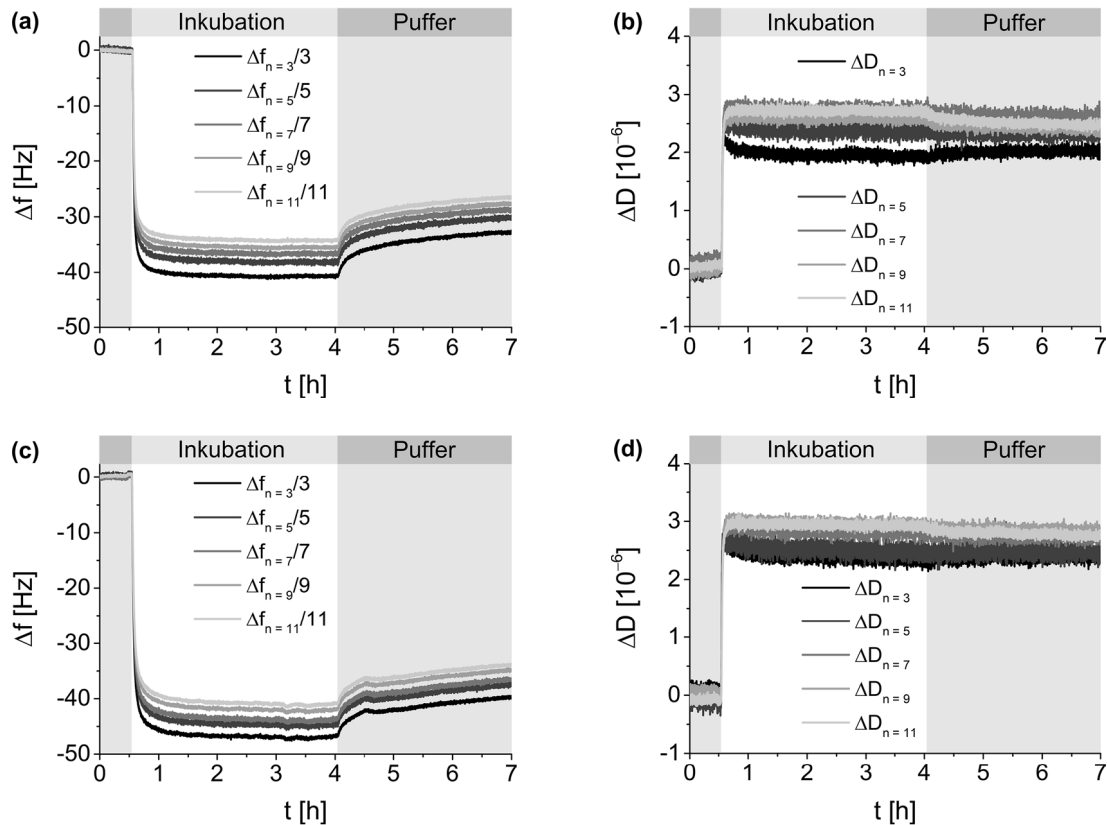


Abbildung E49. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des linearen Dimeres $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$ und des verzweigten Dimeres $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$. $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$: Frequenzänderungen (c) und Dissipationsänderungen (d). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibrierung mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation mit $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ der jeweiligen Biokonjugat-Lösung ($8.0 \mu\text{M}$ $(\text{G-TBP})_2\text{-PEG}^{\text{CHEM}}$; $8.0 \mu\text{M}$ $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.7 ADSORPTIONSVERHALTEN DER SCHWACH-BINDENDEN DIMERE $(\text{S4})_2\text{K-PEG}$ UND $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$

Das Peptid-PEG-Konjugat $(\text{S4})_2\text{K-PEG}$ wurden mit einer Konzentration von $69 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($8.0 \mu\text{M}$) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** vermessen. Für $(\text{S7})_2\text{K-PEG}$ ($75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $8.0 \mu\text{M}$) wurde die Messung unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die entsprechenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen auf titan-beschichteten Sensorkristallen (QX 310 Ti) sind in **Abbildung E50** dargestellt.

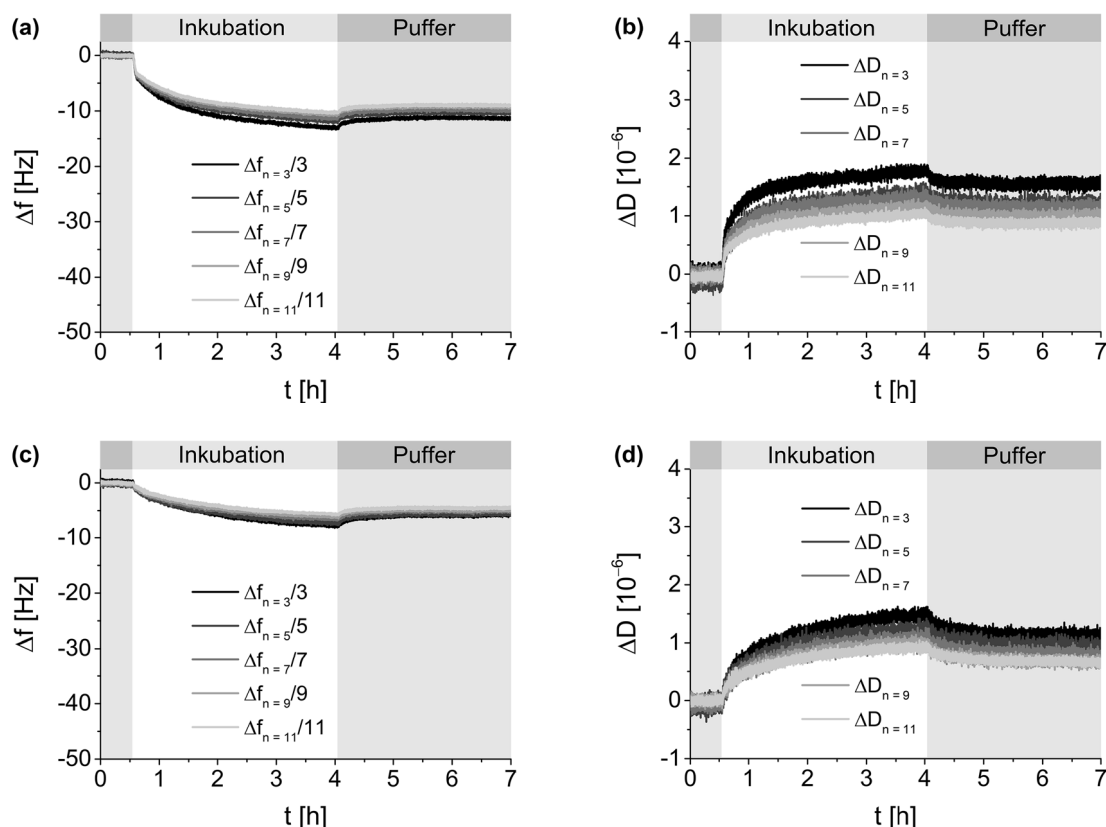


Abbildung E50. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der schwach-bindenden Dimere **(S4)₂K-PEG** und **(S7)₂K-PEG**. **(S4)₂K-PEG**: Frequenzänderungen **(a)** und Dissipationsänderungen **(b)**. **(S7)₂K-PEG**: Frequenzänderungen **(c)** und Dissipationsänderungen **(d)**. Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibrierung mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation mit 8.0 μM der jeweiligen Biokonjugat-Lösung (69 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ **(S4)₂K-PEG**; 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ **(S7)₂K-PEG**) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.8 KONZENTRATIONSABHÄNGIGES ADSORPTIONSVERHALTEN DES VERZWEIGTEN DIMERES **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}**

Zur Bestimmung der Assoziationssättigungskonstante K_A für **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** nach dem LANGMUIR'schen Adsorptionsmodell (vgl. **Kapitel 3.1.9** Seite 63) wurden verschiedene Konzentrationen von 0.01 μM , 0.1 μM , 0.5 μM , 1.0 μM , 2.5 μM und 5.5 μM des Peptid-PEG-Konjugates in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** dreifach vermessen. **Abbildung E51** zeigt exemplarisch die Adsorptionsisothermen der verschiedenen Konzentrationen des verzweigten Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** auf titanbeschichteten Sensor-kristallen (QSX 310 Ti).

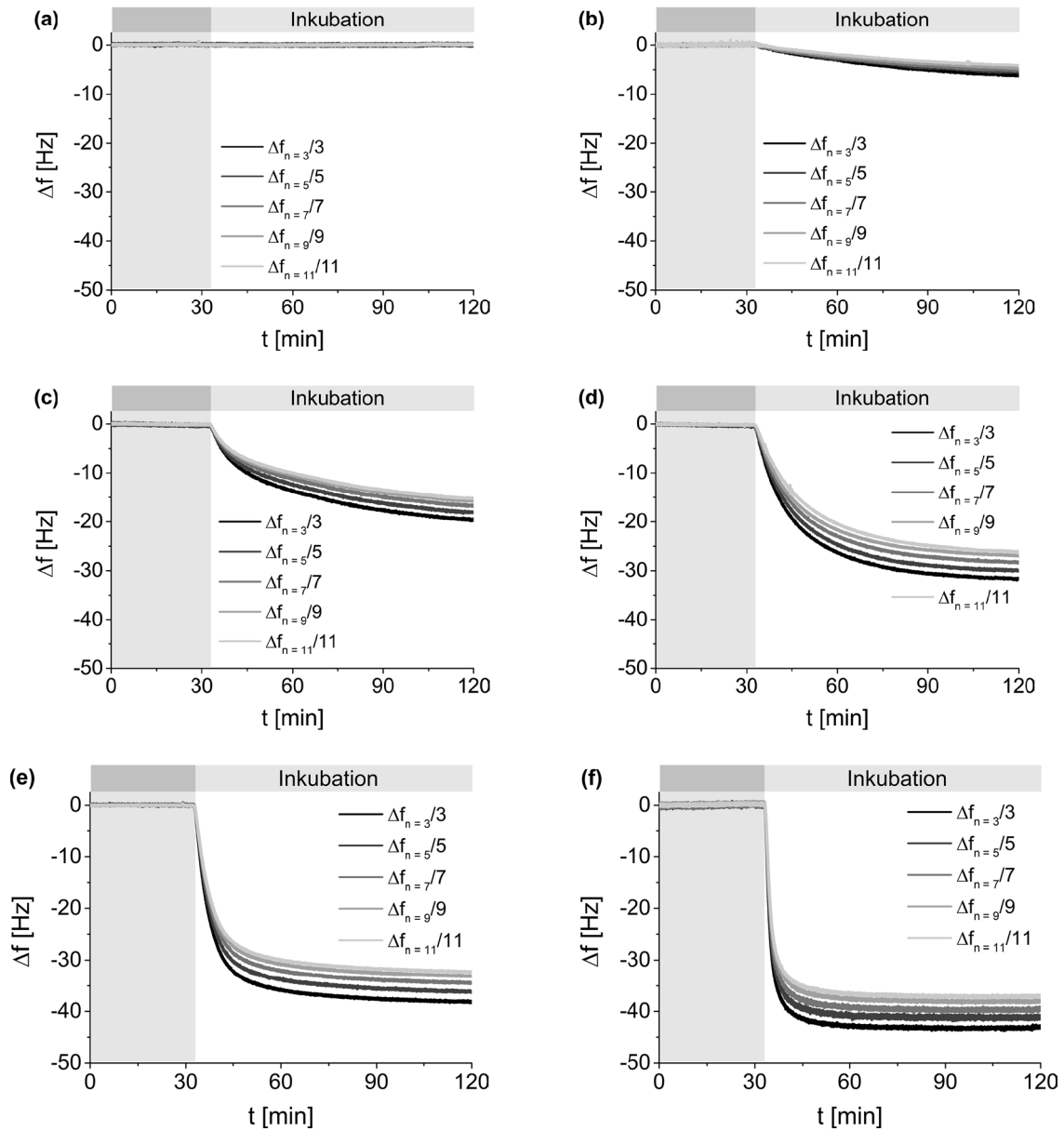


Abbildung E51. Adsorptionsisothermen der verschiedenen Konzentrationen $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$. Frequenzänderungen $0.01 \mu\text{M}$ (a), Frequenzänderungen $0.1 \mu\text{M}$ (b), Frequenzänderungen $0.5 \mu\text{M}$ (c), Frequenzänderungen $1.0 \mu\text{M}$ (d), Frequenzänderungen $2.5 \mu\text{M}$ (e) und Frequenzänderungen $5.5 \mu\text{M}$ (f). Bedingungen: 0 – 33 min – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 33 – 120 min – Inkubation der jeweiligen Konzentration der Biokonjugat-Lösung von $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

Für die Konzentration von $0.01 \mu\text{M}$ $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ (vgl. **Abbildung E51a**) konnte innerhalb des betrachteten Zeitraums keine Materialanreicherung auf der Sensoroberfläche detektiert werden. Zur Berechnung von K_A wurde die Adsorption der verschiedenen Konzentrationen des Biokonjugates $(\text{G-TBP})_2\text{K-PEG}^{\text{CHEM}}$ dreifach vermessen und die maximal erzielten Frequenzänderungen Δf_{max} nach einer Inkubationszeit von 90 min bestimmt. Die erhaltenen Messwerte sowie der Quotient aus der Konzentration $-c$ und den gemittelten Frequenzänderungen $\bar{\Delta f}_{\text{max}}$ sind in **Tabelle E7** aufgeführt.

Tabelle E7. Maximal erzielte Frequenzänderungen Δf_{\max} sowie der Quotient aus der Konzentration $-c$ und den gemittelten maximal erzielten Frequenzänderungen $\bar{\Delta f}_{\max}$ für die konzentrationsabhängige Adsorption des verzweigten Dimeres **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** zur Bestimmung der Assoziationssättigungskonstante K_A nach dem LANGMUIR'schen Adsorptionsmodell.

(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}	Messung 1 [Hz]	Messung 2 [Hz]	Messung 3 [Hz]	$-c/\bar{\Delta f}_{\max}$ [$\mu\text{M}\cdot\text{Hz}^{-1}$]
0.01 μM	0.0	–	–	–
0.1 μM	–7.9	–5.9	–6.3	$15.2 \pm 0.2 \cdot 10^{-3}$
0.5 μM	–19.6	–24.6	–24.9	$22.0 \pm 0.3 \cdot 10^{-3}$
1.0 μM	–35.9	–25.0	–31.7	$33.1 \pm 0.6 \cdot 10^{-3}$
2.5 μM	–38.4	–38.2	–42.3	$63.2 \pm 0.4 \cdot 10^{-3}$
5.5 μM	–43.1	–48.3	–39.8	$126.6 \pm 1.2 \cdot 10^{-3}$

5.7.9 EXPERIMENTE ZUR ENZYMATISCHEN AKTIVIERUNG VON **(S7)₂K-PEG**

5.7.9.1 Adsorptionsverhalten des enzymatisch aktivierten **(S7)₂K-PEG**

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens des enzymatisch aktivierten **(S7)₂K-PEG** wurde die Ansatzgröße des in **Tabelle E6** aufgeführten Protokolls (vgl. **Kapitel 5.6.1.1** Seite 143) auf ein Gesamtvolumen von 800.0 μL hochskaliert. Dazu wurden 1.30 mg (0.14 μM) **(S7)₂K-PEG** in MQH₂O aufgenommen und 80.0 μL des 10× TEV Puffers hinzugefügt. Die Zugabe von 72 Units der Enzymcharge #2 der TEV Protease (spezifische Aktivität: 10 Units· μL^{-1} ; 7.20 μL) markierte den Beginn der Enzymreaktion unter den Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris·HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME bei einer Temperatur von 30 °C. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Drehzahl von 600 min^{–1} wurden 100.0 μL der Aktivierungslösung entnommen und die katalytische Aktivität des Enzyms durch die Zugabe von 100.0 μL einer 10 mM Lösung Iodacetamid in MQH₂O versetzt mit 0.2 % HCOOH (v/v) inhibiert. Der Substratumsatz wurde mittels analytischer HPLC nach einer Normierung entsprechend der in **Tabelle E4** angegebenen 67%igen Reinheit von **(S7)₂K-PEG** (vgl. **Kapitel 5.5.16.1** Seite 136) auf 79 % bestimmt. Für die Messung wurde die verbleibenden Aktivierungslösung 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf Konzentrationen von 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5.5 μM) **(G-TBP)₂K-PEG^{ENZ}** sowie 5 Units· μL^{-1} TEV Protease verdünnt und das Experiment nach **Protokoll 8** durchgeführt. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des enzymatisch aktivierten **(S7)₂K-PEG** auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E52** dargestellt.

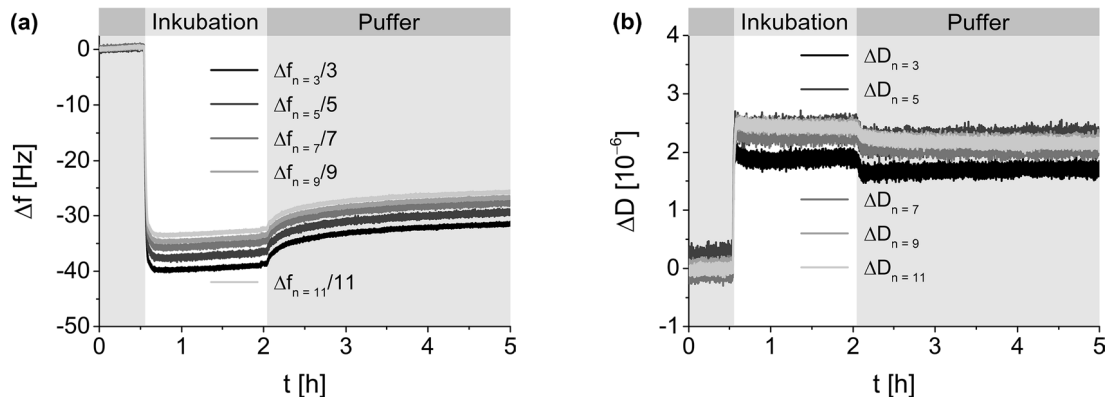


Abbildung E52. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des enzymatisch aktivierten (S7)₂K-PEG: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 2.08 h – Inkubation der Aktivierungslösung 1:17 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5.5 μM) (G-TBP)₂K-PEG^{ENZ} und 5 Units $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ TEV Protease; 2.08 – 5.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.9.2 Referenzexperiment: nicht-aktiviertes (S7)₂K-PEG ohne TEV Protease

1.00 mg (0.11 μmol) (S7)₂K-PEG wurden ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O aufgenommen und 61.7 μL des 10 \times TEV Puffers zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min⁻¹ wurde die Referenzlösung 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von 98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (10.4 μM) (S7)₂K-PEG verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des nicht-aktivierten (S7)₂K-PEG auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (Qsx 310 Ti) sind in **Abbildung E53** dargestellt.

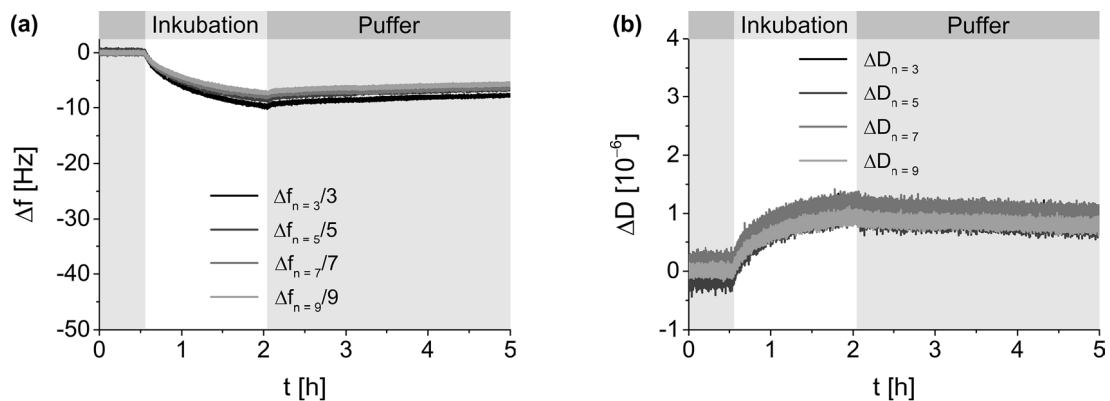


Abbildung E53. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des nicht-aktivierten (S7)₂K-PEG: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 2.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:17 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (10.4 μM) (S7)₂K-PEG; 2.08 – 5.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.9.3 Referenzexperiment: $(G-TBP)_2K-PEG^{CHEM}$ ohne TEV Protease

0.35 mg (0.06 μmol) des synthetischen Analogons $(G-TBP)_2K-PEG^{CHEM}$ wurden ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O aufgenommen und 61.7 μL des 10 \times TEV Puffers zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5.5 μM) $(G-TBP)_2K-PEG^{CHEM}$ verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen von $(G-TBP)_2K-PEG^{CHEM}$ auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E54** dargestellt.

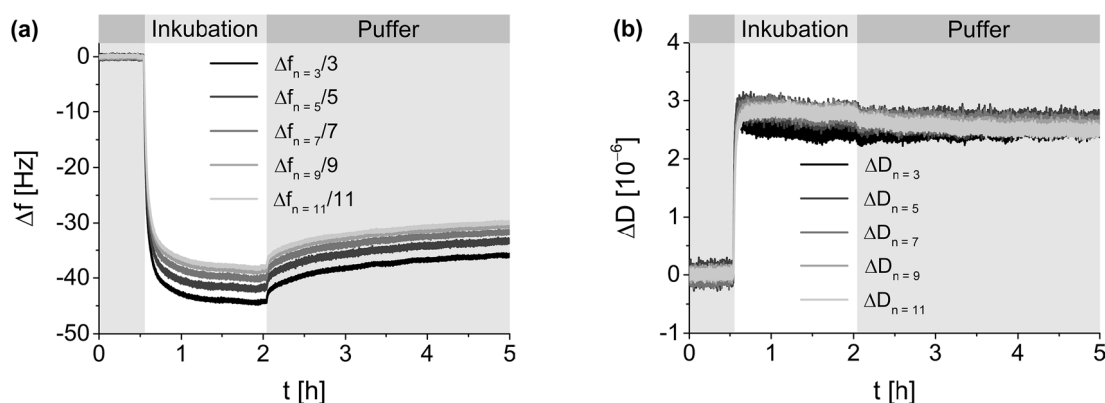


Abbildung E54. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der Aktivierungsreferenz $(G-TBP)_2K-PEG^{CHEM}$: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 2.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:17 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5.5 μM) $(G-TBP)_2K-PEG^{CHEM}$; 2.08 – 5.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.9.4 Referenzexperiment: Suppressionsdomäne $IF7^{CHEM}$ ohne TEV Protease

0.09 mg (0.06 μmol) des synthetischen Analogons der Suppressionsdomäne $IF7^{CHEM}$ wurden ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O aufgenommen und 61.7 μL des 10 \times TEV Puffers zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von 9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5.5 μM) $IF7^{CHEM}$ verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen der Suppressionsdomäne $IF7^{CHEM}$ auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E55** dargestellt.

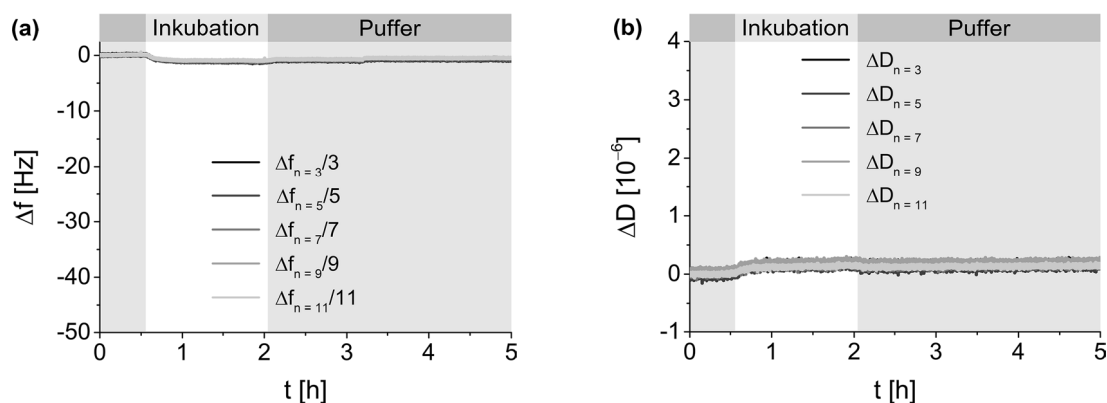


Abbildung E55. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des synthetischen Analogons der Suppressionsdomäne **IF7^{CHEM}**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 2.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:17 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf $14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($11.2 \mu\text{M}$) **IF7^{CHEM}**; 2.08 – 5.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.9.5 Referenzexperiment: artifizielle Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] ohne TEV Protease

Basierend auf dem mittels analytischer HPLC bestimmten Substratumsatz des enzymatisch aktivierten **(S7)₂K-PEG** von 79 % (vgl. **Kapitel 5.7.9.1** Seite 158) wurde eine artifizielle Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] bestehend aus den synthetischen Analoga des Binders **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** und der Suppressionsdomäne **IF4^{CHEM}** sowie des verbleibenden Eduktes **(S7)₂K-PEG** in Protease-Puffer hergestellt. Dazu wurden 0.25 mg ($0.06 \mu\text{mol}$) **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}**, 0.09 mg ($0.06 \mu\text{mol}$) **IF7^{CHEM}** und 0.47 mg ($0.05 \mu\text{mol}$) des Substrates **(S7)₂K-PEG** ohne den Zusatz der TEV Protease in MQH₂O aufgenommen und $61.7 \mu\text{L}$ des 10× TEV Puffers zu einem Endvolumen von $617.3 \mu\text{L}$ hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris·HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf Konzentrationen von $35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($5.5 \mu\text{M}$) **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}**, $9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($5.5 \mu\text{M}$) **IF7^{CHEM}** und $46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($4.9 \mu\text{M}$) **S4-PEG** verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen der artifiziellen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %] auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QSX 310 Ti) sind in **Abbildung E56** dargestellt.

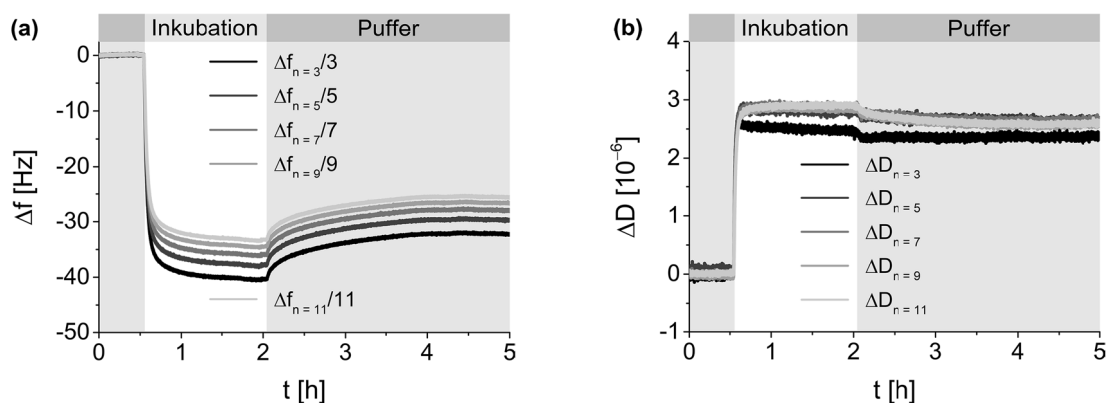


Abbildung E56. Adsorptions- und Desorptionsisothermen der künstlichen Referenz **REF2^{CHEM}** [79 %]: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 2.08 h – Inkubation der Referenzlösung 1:17 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf Konzentrationen von 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5.5 μM) (**(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}**, 9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5.5 μM) **IF7^{CHEM}** und 46 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (4.9 μM) (**(S7)₂K-PEG**; 2.08 – 5.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.10 REFERENZEXPERIMENTE DER TEV PROTEASE

5.7.10.1 Referenzexperiment: Adsorptionsverhalten der TEV Protease zur Aktivierung von **S4-PEG**

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der Enzymcharge #1 der TEV Protease zur Aktivierung von **S4-PEG** wurden 56 Units (spezifische Aktivität: 5 Units· μL^{-1} ; 5.56 μL) in MQH₂O aufgenommen und 61.7 μL des 10× TEV Puffers (v/v) zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris·HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min⁻¹ wurde die Referenzlösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von 2 Units·mL⁻¹ TEV Protease verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. In einem Kreuzexperiment wurde das Adsorptionsverhalten von 28 Units der Enzymcharge #2 der TEV Protease (spezifische Aktivität: 10 Units· μL^{-1} ; 2.78 μL) unter den zuvor beschriebenen Bedingungen untersucht. Die entsprechenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen der beiden Enzymchargen der TEV Protease auf titanbeschichteten Sensorkristallen (Qsx 310 Ti) sind in **Abbildung E57** dargestellt.

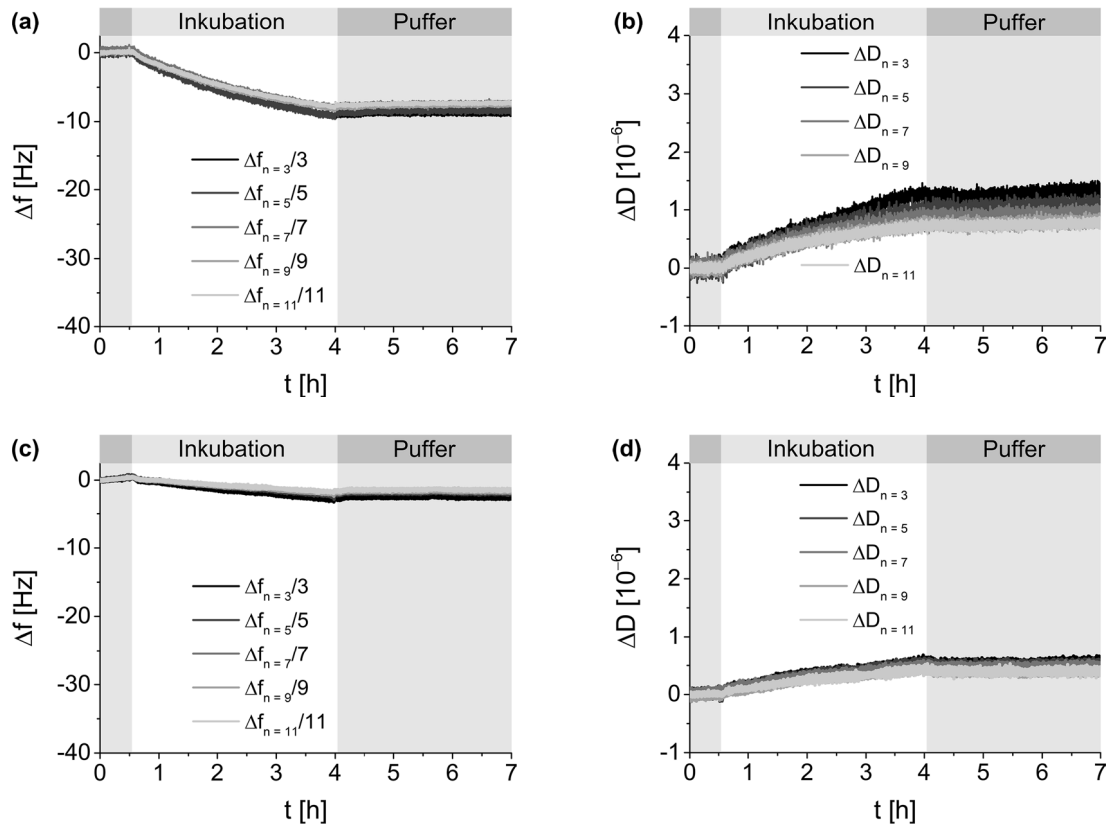


Abbildung E57. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von 28 Units der Enzymcharge #1 (spezifische Aktivität: 5 Units· μL^{-1}) der TEV Protease zur Aktivierung von **S4-PEG** im Vergleich zu Enzymcharge #2 (spezifische Aktivität: 10 Units· μL^{-1}): Enzymcharge #1: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Enzymcharge #2: Frequenzänderungen (c) und Dissipationsänderungen (d). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation der jeweiligen Referenzlösung 1:25 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 2 Units· mL^{-1} TEV Protease; 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.10.2 Referenzexperiment: Adsorptionsverhalten der TEV Protease zur Aktivierung von **(S7)₂K-PEG**

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der *Enzymcharge* #2 der TEV Protease zur Aktivierung von **(S7)₂K-PEG** wurden 28 Units (spezifische Aktivität: 10 Units· μL^{-1} ; 2.78 μL) in MQH_2O aufgenommen und 61.7 μL des 10× TEV Puffers zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris·HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min^{-1} wurde die Referenzlösung 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von 4 Units· mL^{-1} TEV Protease verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. In einem Kreuzexperiment wurde das Adsorptionsverhalten von 56 Units der Enzymcharge #1 der TEV Protease (spezifische Aktivität: 5 Units· μL^{-1} ; 11.1 μL) unter den zuvor beschriebenen Bedingungen untersucht. Die entsprechenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen der beiden Enzymchargen der TEV Protease auf titanbeschichteten Sensorkristallen (Qsx 310 Ti) sind in **Abbildung E58** dargestellt.

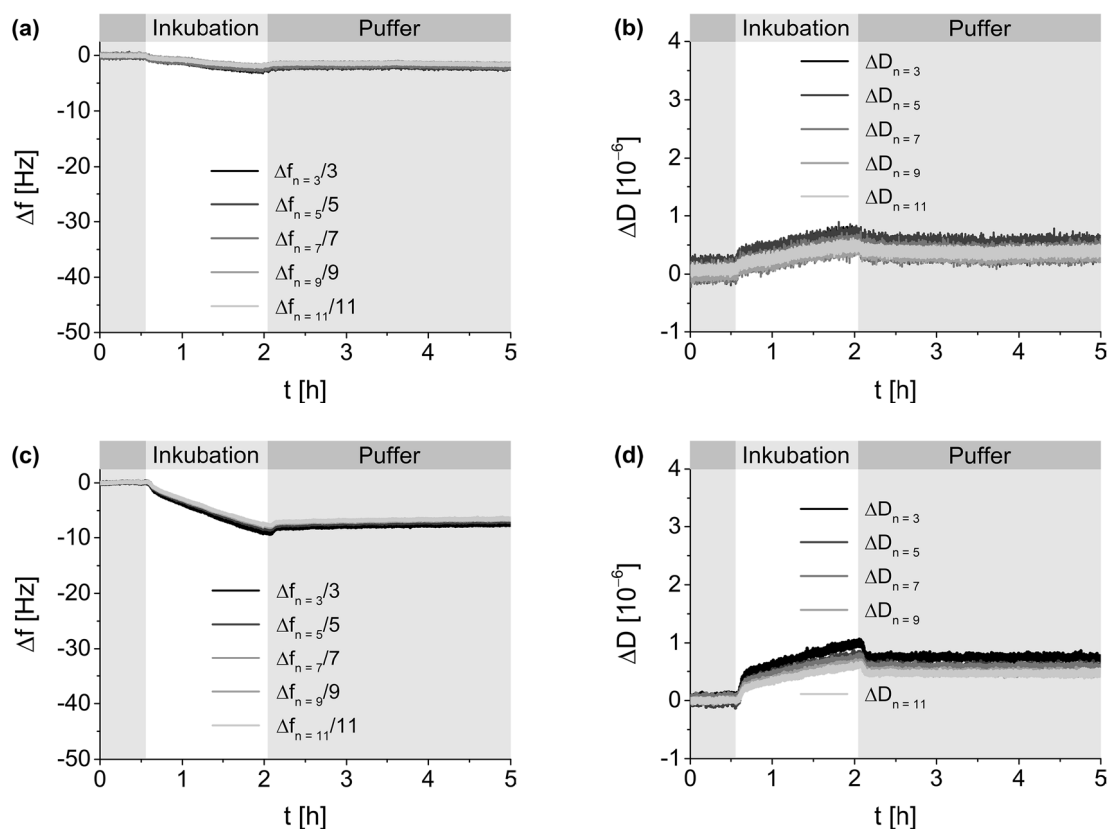


Abbildung E58. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von 56 Units der Enzymcharge #2 (spezifische Aktivität: 10 Units·μL⁻¹) der TEV Protease zur Aktivierung von (S7)₂K-PEG im Vergleich zu Enzymcharge #1 (spezifische Aktivität: 5 Units·μL⁻¹): Enzymcharge #2: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Enzymcharge #1: Frequenzänderungen (c) und Dissipationsänderungen (d). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 2.08 h – Inkubation der jeweiligen Referenzlösung 1:17 (v/v) verdünnt in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf 4 Units·mL⁻¹ TEV Protease; 2.08 – 5.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.11 ANTIFOULING-EIGENSCHAFTEN DER BIOKONJUGAT-BESCHICHTUNGEN

5.7.11.1 Stabilität der Beschichtungen der synthetischen Analoga **G-TBP-PEG^{CHEM}** und **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** gegenüber der Adsorption von BSA

Um die Oberfläche eines titanbeschichteten Sensorkristalls (QX 310 Ti) mit Biokonjugat zu beschichten, wurden 0.79 mg (0.18 μmol) **G-TBP-PEG^{CHEM}** in MQH₂O aufgenommen und 61.7 μL des 10× TEV Puffers zu einem Endvolumen von 617.3 μL hinzugegeben, um die Aktivierungsbedingungen von 25 mM Tris·HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 14 mM 2ME einzustellen. Anschließend wurde die Biokonjugat-Lösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von 50 μg·mL⁻¹ (11.2 μM) **G-TBP-PEG^{CHEM}** verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Sobald die aufgezeichneten Frequenz- und Dissipationsänderungen während des Spülens mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) konstante Werte annahmen, wurde die Biokonjugat-Beschichtung mit einer Lösung von BSA in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mit einer Konzentration von 10 mg·mL⁻¹ behandelt. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf mit **G-TBP-PEG^{CHEM}** beschichtetem TiO₂ sind in **Abbildung E59** dargestellt.

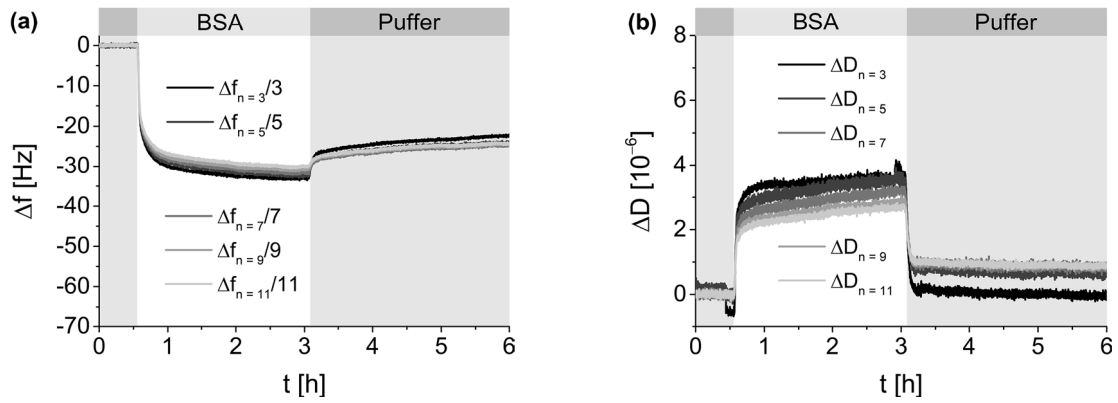


Abbildung E59. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf mit **G-TBP-PEG^{CHEM}** beschichtetem TiO₂: Frequenzänderungen **(a)** und Dissipationsänderungen **(b)**. Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 3.08 h – Inkubation mit 10 mg·mL⁻¹ BSA in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 3.08 – 6.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

Für die Beschichtung von **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** wurden 1.19 mg (0.13 μmol) des Biokonjugates wie zuvor beschrieben behandelt. Anschließend wurde die Biokonjugat-Lösung 1:25 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf eine Konzentration von 50 μg·mL⁻¹ (8.0 μM) **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** verdünnt und nach **Protokoll 8** vermessen. Sobald die aufgezeichneten Frequenz- und Dissipationsänderungen während des Spülens mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) konstante Werte annahmen, wurde die Biokonjugat-Beschichtung mit einer Lösung von BSA in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mit einer Konzentration von 10 mg·mL⁻¹ behandelt. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf mit **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** beschichtetem TiO₂ sind in **Abbildung E60** dargestellt.

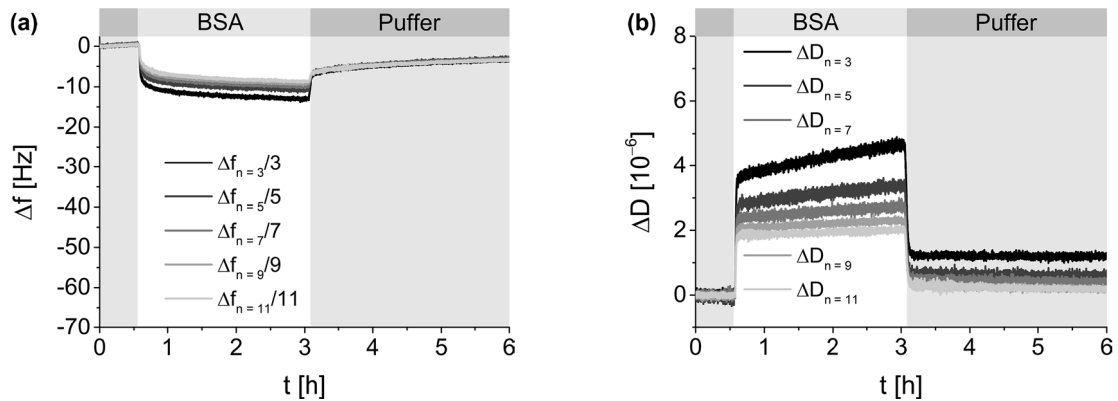


Abbildung E60. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf mit **(G-TBP)₂K-PEG^{CHEM}** beschichtetem TiO₂: Frequenzänderungen **(a)** und Dissipationsänderungen **(b)**. Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 3.08 h – Inkubation mit 10 mg·mL⁻¹ BSA in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 3.08 – 6.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.11.2 Stabilität der Beschichtung des enzymatisch aktivierten (S7)₂K-PEG^{CHEM} gegenüber der Adsorption von BSA

Um die Oberfläche eines titanbeschichteten Sensorkristalls (QX 310 Ti) mit enzymatisch aktiviertem (S7)₂K-PEG zu beschichten, wurde die Enzymreaktion nach der in **Kapitel 5.7.9.1** (vgl. Seite 158) beschriebenen Ansatzgröße und Messvorschrift durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei einer Temperatur von 30 °C und einer Drehzahl von 600 min⁻¹ wurden 100.0 µL der Aktivierungslösung entnommen und die katalytische Aktivität des Enzyms durch die Zugabe von 100.0 µL einer 10 mM Lösung Iodacetamid in MQH₂O versetzt mit 0.2 % HCOOH (v/v) inhibiert. Der Substratumsatz wurde mittels analytischer HPLC nach einer Normierung entsprechend der 67%igen Reinheit von (S7)₂K-PEG (vgl. **Kapitel 5.5.16** Seite 134) auf 79 % bestimmt. Für die Messung wurde die Aktivierungslösung 1:17 (v/v) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) auf Konzentrationen von 35 µg·mL⁻¹ (5.5 µM) (G-TBP)₂K-PEG^{ENZ} sowie 5 Units·µL⁻¹ TEV Protease verdünnt und das Experiment nach **Protokoll 8** durchgeführt. Sobald die aufgezeichneten Frequenz- und Dissipationsänderungen während des Spülens mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) konstante Werte annahmen, wurde die Biokonjugat-Beschichtung mit einer Lösung von BSA in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mit einer Konzentration von 10 mg·mL⁻¹ behandelt. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf mit enzymatisch aktiviertem (S7)₂K-PEG beschichtetem TiO₂ sind in **Abbildung E61** dargestellt.

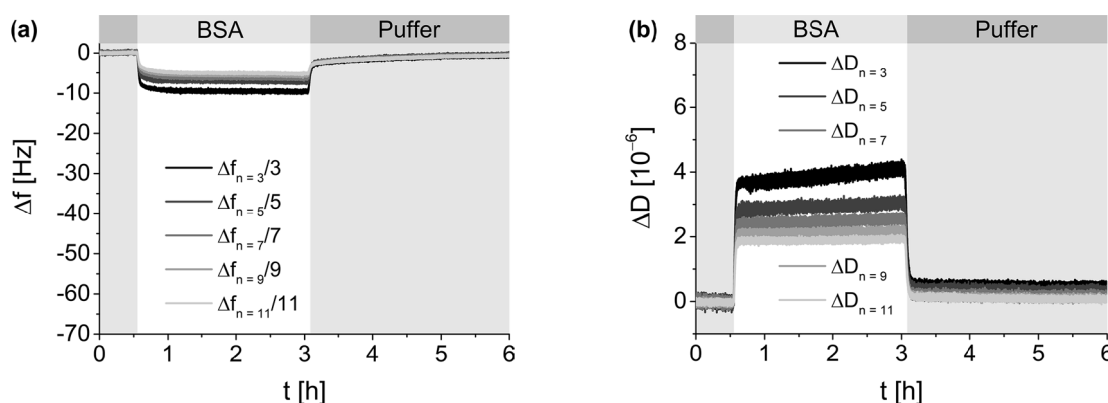


Abbildung E61. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf mit enzymatisch aktiviertem (S7)₂K-PEG beschichtetem TiO₂: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 3.08 h – Inkubation mit 10 mg·mL⁻¹ BSA in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 3.08 – 6.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.11.3 Referenzexperiment: Rinderserumalbumin (BSA) auf unbeschichtetem TiO₂

Das Modellprotein BSA wurde mit einer Konzentration von 10 mg·mL⁻¹ in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen von BSA auf einem titanbeschichteten Sensorkristall (QX 310 Ti) sind in **Abbildung E62** dargestellt.

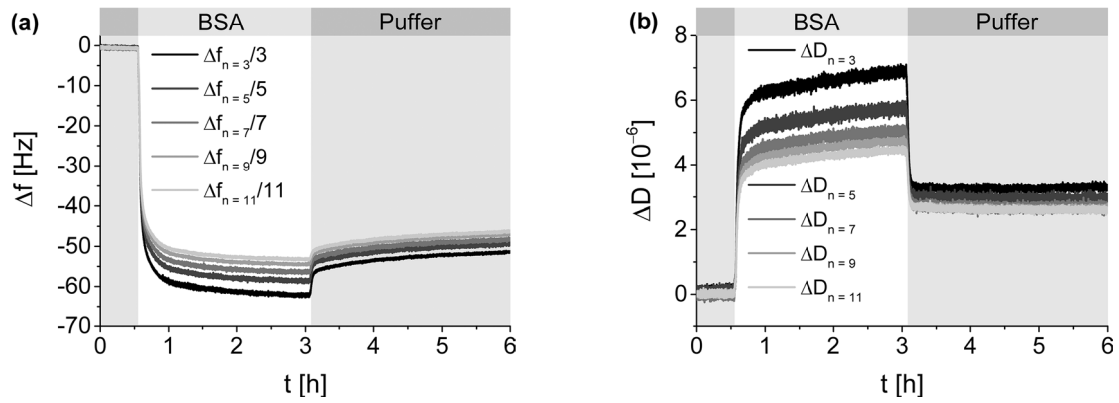


Abbildung E62. Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf unbeschichtetem TiO₂: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 3.08 h – Inkubation mit 10 mg·mL⁻¹ BSA in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 3.08 – 6.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.12 ADSORPTIONSVERHALTEN AUF SILICIUMDIOXID-OBERFLÄCHEN

5.7.12.1 Adsorptionsverhalten von **G-TBP-PEG^{CHEM}**

Das Peptid-PEG-Konjugat **G-TBP-PEG^{CHEM}** wurde mit einer Konzentration von 50 µg·mL⁻¹ (11.2 µM) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** vermessen. Die Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}** auf einem mit Siliciumdioxid beschichteten Sensorkristall (Qsx 303 SiO₂) sind in **Abbildung E63** dargestellt.

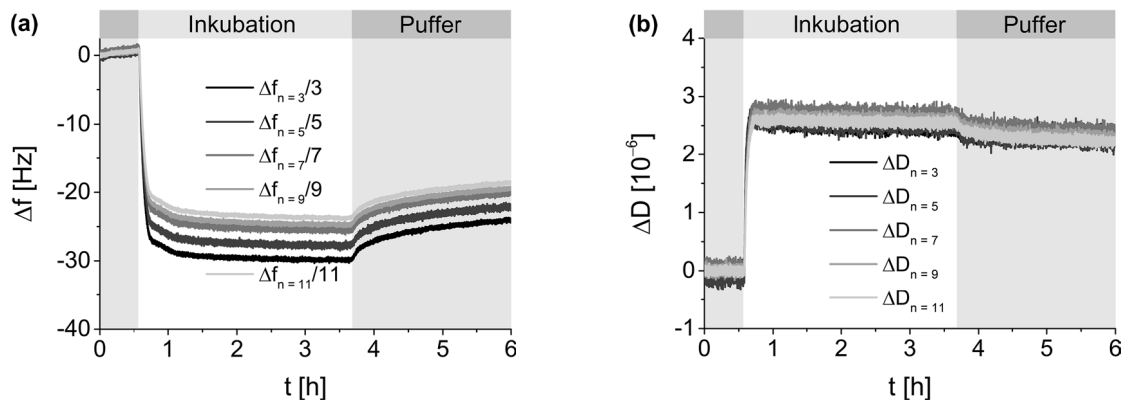


Abbildung E63. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **G-TBP-PEG^{CHEM}**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation mit 50 µg·mL⁻¹ Biokonjugat-Lösung (11.2 µM **G-TBP-PEG^{CHEM}**) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.7.12.2 Adsorptionsverhalten von **S4-PEG**

Das Peptid-PEG-Konjugat **S4-PEG** wurde mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($8.8 \mu\text{M}$) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) aufgenommen und nach **Protokoll 8** vermessen. Die entsprechenden Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **S4-PEG** auf einem mit Siliciumdioxid beschichteten Sensorkristall (QSX 303 SiO₂) sind in **Abbildung E64** dargestellt.

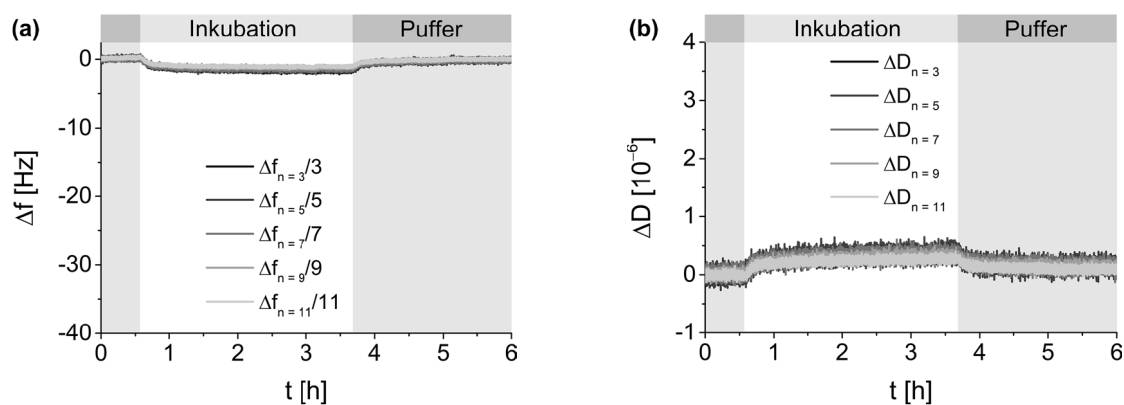


Abbildung E64. Adsorptions- und Desorptionsisothermen von **S4-PEG**: Frequenzänderungen (a) und Dissipationsänderungen (b). Bedingungen: 0.00 – 0.58 h – Äquilibration mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 0.58 – 4.08 h – Inkubation mit $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Biokonjugat-Lösung ($8.8 \mu\text{M}$ **S4-PEG**) in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0); 4.08 – 7.00 h – Spülen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.8 Peptidfunktionalisierte Biosensor-Systeme

5.8.1 MALEINIMID-FUNKTIONALISIERTE PEG-HYDROGELPARTIKEL

Die Synthese und Funktionalisierung der elastischen PEG-Mikropartikel mit Carboxylgruppen durch CA-Monomere zur Einführung der Maleinimid-Funktionen wurde von HANQING WANG aus der Arbeitsgruppe LAURA HARTMANN (Abteilung Makromolekulare Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Die Synthesevorschriften zur Darstellung von PEG-CA-Mikropartikeln sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen.^[257, 262] Die nachfolgende Umsetzung mit 2-Maleinimid-Ethylamin zu Maleinimid-funktionalisierten PEG-SCPs **[PEG]-Mal** ist in **Tabelle E8** beschrieben.

Tabelle E8. Vorschrift zur Umsetzung von PEG-CA-Mikropartikeln mit 2-Maleinimid-Ethylamin zu den entsprechend Maleinimid-funktionalisierten PEG-SCPs **[PEG]-Mal**.

Schritte	Experimentelle Vorgehensweise	Zentrifugation
1 Waschen	Suspension PEG-CA-Mikropartikel 3 x 20 mL DMF	jeweils 15 min
2 Voraktivierung in 20 mL DMF	1456 mg PyBOP 194 mg HOBt 240 µL DIPEA	10 min schütteln
3 Kupplung	10 mg 2-Maleinimid-Ethylamin	3 h schütteln
4 Waschen	3 x 20 mL DMF	jeweils 15 min

Der Funktionalisierungsgrad FD [Mal] wurde mittels photometrischer TBO-Titration der nicht umgesetzten Carboxylgruppen indirekt bestimmt.^[349, 350] Die PEG-SCPs wurden bei Temperaturen von 4 – 8 °C in DMF gelagert. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten SCP-Chargen **[PEG]-Mal** sind **Tabelle E9** angegeben.

Tabelle E9. Chemische und physikalische Eigenschaften der verwendeten SCP-Chargen Maleinimid-funktionalisierter PEG-Hydrogelpartikel **[PEG]-Mal**.

Parameter [PEG]-Mal	SCP-Charge #1	SCP-Charge #2	SCP-Charge #3
PEG-Diacrylamid Monomer	$8 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$8 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$8 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Elastizitätsmodul	$32 \pm 5 \text{ kPa}$	$32 \pm 5 \text{ kPa}$	$32 \pm 5 \text{ kPa}$
CA-Carboxylfunktionen FD [COOH]	–	$15 \pm 1 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	$23 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
Maleinimid-Funktionen FD [Mal]	$80 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	$36 \pm 5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	$35 \pm 3 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
umgesetzte CA-Carboxylfunktionen	–	71 %	60 %
Konzentration der Dispersion	$3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
Durchmesser der Partikel	–	$30 \pm 14 \mu\text{m}$	–
Zeta-Potential in Standard-PBS (pH 7.4)	–	$-2.6 \pm 1.1 \text{ mV}$	–

5.8.2 IMMOBILISIERUNG VON CYSTEIN-PEPTIDEN

Für die Immobilisierung der Cystein-Peptide **PEP^{RhB}** und **PEP^{TBP}** an **[PEG]-Mal** wurden zwei verschiedene Vorschriften (**Protokoll A** und **Protokoll B**) mit festgelegten Waschschritten und Zentrifugationszeiten zur Sedimentation der Kolloide entwickelt. Diese dienten zur Vorbereitung der Ligationsbedingungen der verschiedenen Reaktionsansätze sowie zur Abtrennung der nicht-kovalent gebundenen Peptide nach der Ligation. Die Ligationen wurden mit definierten Mengen der Partikeldispersionen der jeweiligen SCP-Chargen in silikonbeschichteten Mikrozentrifugenröhrchen (*Sigma-Aldrich*[®], 1.7 mL) durchgeführt. Als Ligationspuffer wurde ein 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mit 2 M Guanidinhydrochlorid (pH 7.0) verwendet. Die Bestimmung der relativen Peptidbeladungen FD [**PEP^{RhB}**] [%] und der finalen Funktionalisierungsgrade FD [**PEP^{RhB}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] erfolgten mittels analytischer RP-UHPLC.

5.8.2.1 Quantitative Analyse der Oxidation des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}**

Erste Vorarbeiten zur Immobilisierung von 162 μM Cystein-Peptid **PEP^{RhB}** an 200 μL Partikeldispersion **[PEG]-Mal** (SCP-Charge #1: 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) wurden in einem 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) ohne 2 M Guanidinhydrochlorid (pH 7.0) durchgeführt. Nach 4 Stunden wurde die Dispersion durch 10-minütiges Zentrifugieren sedimentiert, 15 μL Lösung aus dem Überstand entnommen und nach einer Verdünnung von 3:10 (v/v) in 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mittels analytischer RP-UHPLC vermessen. Das UHPLC-Chromatogramm (**Abbildung E65**) zeigt die partielle Oxidation des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** zum korrespondierenden Disulfid [**PEP^{RhB}**]₂ zu etwa 13 % entsprechend des Verhältnisses der Signalflächen der beiden Spezies.

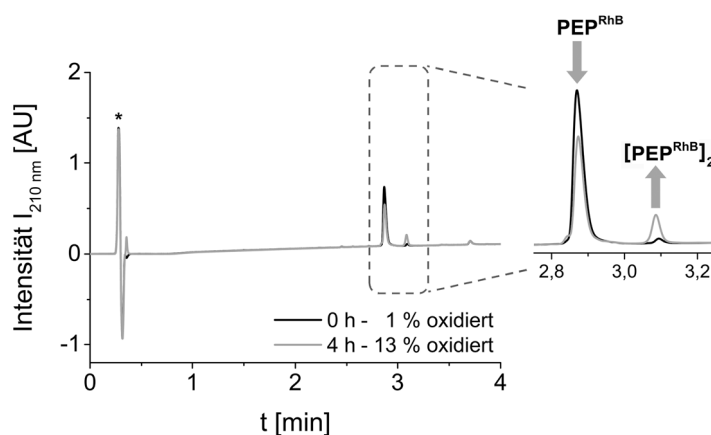


Abbildung E65. Quantitative Analyse der Oxidation des Cystein-Peptides **PEP^{RhB}** unter Bildung des korrespondierenden Disulfides [**PEP^{RhB}**]₂ nach 4 Stunden mittels analytischer RP-UHPLC. Gradient: 10 – 70 % B, 4 min, 210 nm.
 * UV-Vis-Signal des 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0). Bedingungen: 162 μM **PEP^{RhB}** 3:10 (v/v) verdünnt in 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0).

5.8.2.2 Bestimmung des Peptid-Funktionalisierungsgrades

Die Immobilisierung verschiedener Äquivalente PEP^{RhB} an [PEG]-Mal in Ligationspuffer in Gegenwart von 5 Äq. TCEP bezogen auf die eingesetzten Konzentrationen PEP^{RhB} und die Probennahmen zur Bestimmung der Ausgangskonzentrationen sowie der relativen Peptidbeladungen FD [PEP^{RhB}] [%] und der finalen Funktionalisierungsgrade FD [PEP^{RhB}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] mittels analytischer RP-UHPLC erfolgten nach **Protokoll A** (vgl. **Tabelle E10**).

Tabelle E10. Vorschrift zur Immobilisierung verschiedener Äquivalente des Cystein-Peptides PEP^{RhB} an [PEG]-Mal (SCP-Charge #2: $36 \pm 5 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) inklusive Vor- und Nachbereitung der Proben unter Angabe der Zentrifugationszeiten zur Sedimentation der Kolloide (**Protokoll A**).

Schritte	Experimentelle Vorgehensweise	Zentrifugation
1 Probenvorbereitung <i>SCP-Charge #2</i>	300 μL der Suspension [PEG]-Mal Abnehmen des max. Überstandes	mind. 10 min
2 Waschen <i>vor der Ligation</i>	1 x 500 μL MQH ₂ O 2 x 500 μL Ligationspuffer	5 min jeweils 5 min
3 Ligation <i>Ausgangskonzentration</i>	Zugabe verschiedener Äq. PEP^{RhB} in 210 μL Ligationspuffer Abnehmen von 10 μL aus dem Überstand für Messung	30 s schütteln max. 2 min 24 h schütteln
4 Probennahme <i>Umsatzkontrolle</i>	Zentrifugation für Umsatzkontrolle Abnehmen von 10 μL aus dem Überstand	mind. 10 min
5 Probennahme <i>nach der Ligation</i>	Zentrifugation für finale Umsatzkontrolle Abnehmen des Überstandes – davon 10 μL für Messung	mind. 10 min
6 Rückstandsprüfung	1 – 3 x mit 200 – 500 μL Ligationspuffer und jeweils Abnehmen des Überstandes für Messung	jeweils 10 min
7 Waschen <i>nach der Ligation</i>	1 x 500 μL Ligationspuffer 1 x 500 μL MQH ₂ O Schütteln für 10 min in 500 μL 1 M Gu·HCl (pH 7.0) 1 x 500 μL MQH ₂ O	5 min 5 min 5 min jeweils 5 min

An Hand analytischer RP-UHPLC-Messungen konnte der Verbrauch von PEP^{RhB} bzw. $\text{PEP}^{\text{TBP*}}$ zeitlich verfolgt werden. Dafür wurden die entnommenen Aliquoten in MQH₂O/MeCN (4:1, v/v) versetzt mit 0.1 % HCOOH verdünnt (1:4, v/v). Die Waschlösungen zur Rückstandsprüfung wurden unverdünnt vermessen. Die entsprechenden UV-Vis-Signale der Cystein-Peptide ermöglichten aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen Signalfäche und Konzentration eine indirekte Quantifizierung der jeweiligen Peptidbeladungen und Funktionalisierungsgrade. Für die Kalibrierungen wurden verschiedene Konzentrationen in Gegenwart von 5 Äq. TCEP mittels analytischer RP-UHPLC dreifach vermessen. Die entsprechenden Signalfächen wurde mit Hilfe der Chromatographiedatensoftware Empower 3 der Firma Waters bestimmt. In **Abbildung E66** sind die gemittelten Signalfächen der Kalibrierungslösungen in Abhängigkeit von der Konzentration von PEP^{RhB} bzw. $\text{PEP}^{\text{TBP*}}$ aufgetragen. Durch das Anlegen linearer Ausgleichgeraden konnten die Anstiege und Bestimmtheitsmaße ermittelt werden.

Kalibrierung PEP^{RhB}

Kalibrierungslösungen: 5 – 50 μM PEP^{RhB} in Ligationspuffer/MQH₂O/MeCN (5:16:4, v/v/v) versetzt mit 0.1 % HCOOH

Gradient RP-UHPLC: 10 – 70 % B, 4 min, 210 nm

Ausgleichsgerade: $565 \cdot 10^2 \pm 8 \cdot 10^2$ mit $R^2 = 0.99817$ (vgl. **Abbildung E66a**)

Kalibrierung $\text{PEP}^{\text{TBP}^*}$

Kalibrierungslösungen: 5 – 50 μM $\text{PEP}^{\text{TBP}^*}$ in Ligationspuffer/MQH₂O/MeCN (5:16:4, v/v/v) versetzt mit 0.1 % HCOOH

Gradient RP-UHPLC: 5 – 50 % B, 4 min, 210 nm

Ausgleichsgerade: $248 \cdot 10^2 \pm 2 \cdot 10^2$ mit $R^2 = 0.99953$ (vgl. **Abbildung E66b**)

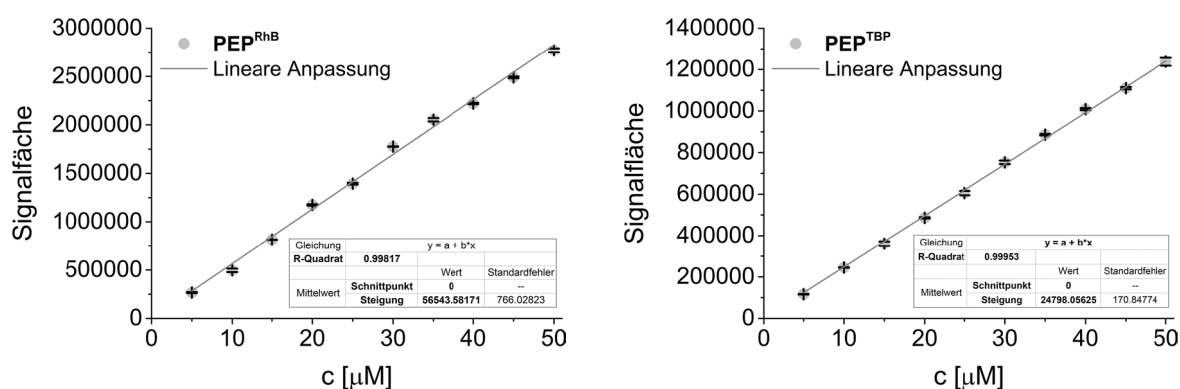


Abbildung E66. Auftragung der mittels analytischer RP-UHPLC bestimmten Signalflächen in Abhängigkeit von der Konzentration Cystein-Peptid: 5 – 50 μM PEP^{RhB} in Ligationspuffer/MQH₂O/MeCN (5:16:4, v/v/v) mit 0.1 % HCOOH (a). Gradient: 10 – 70 % B, 4 min, 210 nm. 5 – 50 μM $\text{PEP}^{\text{TBP}^*}$ in Ligationspuffer/MQH₂O/MeCN (5:16:4, v/v/v) mit 0.1 % HCOOH (b). Gradient: 5 – 50 % B, 4 min, 210 nm.

Die Immobilisierung verschiedener Verhältnisse aus Cystein-Peptiden PEP^{RhB} bzw. $\text{PEP}^{\text{TBP}^*}$ und 2ME an [PEG]-Mal in Ligationspuffer und die Probennahmen zur Bestimmung der entsprechenden Ausgangskonzentrationen sowie der relativen Peptidbeladungen und der finalen Funktionalisierungsgrade mittels analytischer RP-UHPLC erfolgten nach **Protokoll B** (vgl. **Tabelle E11**).

Tabelle E11. Vorschrift zur Immobilisierung verschiedener Verhältnisse aus Cystein-Peptiden **PEP^{RhB}** bzw. **PEP^{TBP*}** und 2ME als fünffacher Überschuss an PEG-SCPs **[PEG]-Mal** (SCP-Charge #3: $35 \pm 3 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) inklusive Vor- und Nachbereitung der Proben unter Angabe der Zentrifugationszeiten zur Sedimentation der Kolloide (**Protokoll B**).

Schritte	Experimentelle Vorgehensweise	Zentrifugation
1 Probenvorbereitung <i>SCP-Charge #3</i>	500 μL der Suspension [PEG]-Mal Abnehmen von 450 μL aus dem Überstand	20 min
2 Ligation <i>Ausgangskonzentration</i>	Zugabe verschiedener Verhältnisse Cystein-Peptid : 2ME in 460 μL Ligationspuffer Abnehmen von 10 μL aus dem Überstand für Messung	30 s schütteln max. 2 min 24 h schütteln
3 Probennahme <i>nach der Ligation</i>	Zentrifugation für finale Umsatzkontrolle Abnehmen des Überstandes – davon 10 μL für Messung	mind. 10 min
4 Waschen <i>für RICM-Messungen</i>	2 x 500 μL MQH ₂ O/MeCN (50:50, v/v) mit 0.1 % TFA 2 x 500 μL PBS (pH 7.0) Dispergieren von 100 μL der Probe in PBS (pH 7.0)	jeweils 10 min jeweils 10 min

An Hand analytischer RP-UHPLC-Messungen konnte der Verbrauch von **PEP^{RhB}** bzw. **PEP^{TBP*}** zeitlich verfolgt werden. Dafür wurden die entnommenen Aliquoten in MQH₂O/MeCN (4:1, v/v) versetzt mit 0.1 % HCOOH verdünnt und mit 100 μM TCEP für 30 min reduziert.

Ansatz 0.50/4.50 Äq. Cystein-Peptid/2ME: 10 μL Probe
30 μL MQH₂O/MeCN (4:1, v/v) mit 0.1 % HCOOH
10 μL 500 μM TCEP

Ansatz 2.50/2.50 Äq. Cystein-Peptid/2ME: 10 μL Probe
70 μL MQH₂O/MeCN (4:1, v/v) mit 0.1 % HCOOH
20 μL 500 μM TCEP

Ansatz 0.00/5.00 Äq. Cystein-Peptid/2ME: 10 μL Probe
150 μL MQH₂O/MeCN (4:1, v/v) mit 0.1 % HCOOH
40 μL 500 μM TCEP

Die relativen Peptidbeladungen FD [**PEP^{TBP*}**] [%] und die finalen Funktionalisierungsgrade FD [**PEP^{TBP*}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] der Reaktionsansätze unter Verwendung verschiedener Verhältnisse **PEP^{TBP*}** und 2ME im Überschuss zur Darstellung von **[PEG]-PEP^{TBP*}** sind in **Tabelle E12** angegeben.

Tabelle E12. Reaktionsansätze zur Immobilisierung verschiedener Verhältnisse **PEP^{TBP*}** und 2ME im Überschuss an **[PEG]-Mal** unter Angabe der relativen Peptidbeladungen FD [**PEP^{TBP*}**] [%] sowie der finalen Funktionalisierungsgrade FD [**PEP^{TBP*}**] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$] der gebildeten **[PEG]-PEP^{TBP*}**.

Bezeichnung	abgeschätzte Äq. PEP ^{TBP*} /2ME	c _{START} [PEP ^{TBP*}] [μM]		FD [PEP ^{TBP*}] [%] 24 h	FD [PEP ^{TBP*}] [$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$]	
		berechnet	gemessen		theoretisch	erhalten
[PEG]-PEP ^{TBP*} [10 %]	0.50/4.50 Äq.	69	75	12	25	4
[PEG]-PEP ^{TBP*} [50 %]	2.50/2.50 Äq.	345	373	52	35	18
[PEG]-PEP ^{TBP*} [100 %]	5.00/0.00 Äq.	690	674	52	35	18

5.8.3 ENZYMATISCHE AKTIVIERUNG PEPTIDFUNKTIONALISierter PEG-SCPs

Für die enzymatische Aktivierung der verschiedenen Reaktionsansätze **[PEG]-PEP^{RhB}** nach **Protokoll B** (vgl. **Tabelle E11** Seite 173) durch die TEV Protease wurde ein spezielles **Protokoll C** (vgl. **Tabelle E13**) mit festgelegten Waschschritten und Zentrifugationszeiten zur Sedimentation der Kolloide entwickelt. Diese dienen zur Vorbereitung der Aktivierungsbedingungen sowie zur Abtrennung der Suppressionsdomäne **IF^{RhB}** und der TEV Protease nach der Aktivierung. Die Aktivierungen wurden mit definierten Mengen der Partikeldispersionen der jeweiligen Reaktionsansätze **[PEG]-PEP^{RhB}** in silikonbeschichteten Mikrozentrifugenröhrchen (*Sigma-Aldrich*[®], 1.7 mL) durchgeführt.

Tabelle E13. Enzymatische Aktivierung der Reaktionsansätze **[PEG]-PEP^{RhB}** nach **Protokoll B** (vgl. **Tabelle E11** Seite 173) durch die TEV Protease inklusive Vor- und Nachbereitung der Proben unter Angabe der Zentrifugationsdauer zur Sedimentation der Kolloide (**Protokoll C**).

Schritte	Experimentelle Vorgehensweise	Zentrifugation
1 Waschen <i>vor der Aktivierung</i>	300 µL der Suspension [PEG]-PEP^{RhB} 2 x 500 µL MQH ₂ O/MeCN (50:50, v/v) mit 0.1 % TFA 3 x 500 µL Protease Puffer Abnehmen des Überstandes	20 min jeweils 10 min jeweils 10 min
2 Aktivierung <i>Berechnung auf PEP^{RhB}</i> <i>[3678.13 g·mol⁻¹]</i>	848.0 µL MQH ₂ O 95.2 µL 10x TEV Puffer 8.56 µL TEV Protease: 86 Units [<i>Enzymcharge #2</i>] 951.8 µL Gesamtvolumen	16 h schütteln
3 Probennahme <i>nach der Aktivierung</i>	Zentrifugation für finale Reaktionskontrolle Abnehmen des Überstandes für MALDI-ToF-MS	mind. 10 min
4 Waschen <i>nach der Aktivierung</i>	Schütteln für 10 min in 500 µL MQH ₂ O/MeCN (50:50, v/v) mit 0.1 % TFA Schütteln für 10 min in 500 µL einer 1:1 Mischung aus MQH ₂ O/MeCN (50:50, v/v) mit 0.1 % TFA und PBS (pH 7.0)	30 min 30 min
5 Waschen <i>für RICM-Messungen</i>	2 x 500 µL PBS (pH 7.0) Dispergieren der Probe in PBS (pH 7.0)	jeweils 30 min

Das nach der enzymatischen Aktivierung von **[PEG]-PEP^{RhB}** [100 %] aus dem Überstand entnommene bzw. durch Waschschriffe abgetrennte Proteolyseprodukt **IF^{RhB}** (vgl. Schritte 3 und 4 **Tabelle E13**) konnte mittels MALDI-ToF-MS identifiziert werden (vgl. **Abbildung E67**). Zusätzlich zu den Addukt-Ionen der Suppressionsdomäne wurden weitere Massensignale von Matrixaddukten^[381, 382] und Matrixclustern^[338] von α CHCA sichtbar. Für die Aktivierung von **[PEG]-PEP^{RhB}** [10 %] und **[PEG]-PEP^{RhB}** [50 %] konnte das Proteolyseprodukt **IF^{RhB}** nach der Inkubation mit der TEV Protease nicht nachgewiesen werden.

MALDI-ToF-MS (m/z): **IF^{RhB}** [C₈₂H₁₀₄N₁₅O₂₃]⁺: 1667.79 g·mol⁻¹, [M+H]⁺ ber. 1668.8, gef. 1668.2; [M+ α CHCA+Na]⁺ ber. 1880.0, gef. 1878.6; Matrixcluster α CHCA [C₁₀H₇NO₃]: 189.17 g·mol⁻¹, [M₄-3H+3Na+K]⁺ ber. 861.7, gef. 861.1; [M₄-H+Na+K]⁺ ber. 817.8, gef. 816.3.

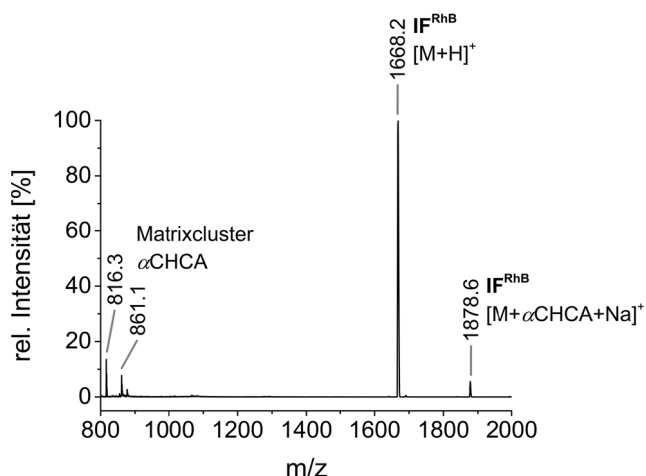


Abbildung E67. MALDI-ToF-MS-Spektrum der enzymatischen Aktivierung von $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [100 %] zur Identifizierung des Proteolyseproduktes IF^{RhB} in der Überstandslösung. Bedingungen Proteolyse: **Protokoll C** (vgl. **Tabelle E13** Seite 174).

5.8.4 RICM-MESSUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER ADHÄSIONSENERGIEN

Die RICM-Messungen wurden von HANQING WANG aus der Arbeitsgruppe LAURA HARTMANN (Abteilung Makromolekulare Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Vorschriften zur Bestimmung der Adhäsionsenergien sowie Angaben zu dem verwendeten RICM-Equipment und zur Vorbereitung der Glasoberflächen für die Bindungsstudien sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen.^[261, 262, 266] Die Messungen erfolgten in einer phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) bestehend aus 20 mM Natriumphosphat (pH 7.0) versetzt mit 154 mM NaCl. Die aktivierten und nicht-aktivierten Peptid-PEG-SCPs sowie die verschiedenen Referenzen für Ligation und Aktivierung wurden entsprechend der jeweiligen Protokolle behandelt und für die Messungen vorbereitet (vgl. **Tabelle E14**).

Tabelle E14. Adhäsionsenergien W_{JKR} der aktivierten und nicht-aktivierten Peptid-PEG-SCPs sowie der verschiedenen Referenzen für Ligation und Aktivierung unter Angabe der entsprechenden Protokolle zur Probenvorbereitung.

Probenvorbereitung	Peptid-PEG-SCPs und Referenz-PEG-SCPs	$W_{\text{JKR}} [\mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}]$
Protokoll B (vgl. Tabelle E11 Seite 173)	nicht-aktivierte $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [10 %]	157 ± 79
	nicht-aktivierte $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [50 %]	158 ± 84
	nicht-aktivierte $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [100 %]	162 ± 44
	$[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{TBP}*}$ [10 %]	359 ± 47
	$[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{TBP}*}$ [50 %]	453 ± 46
	$[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{TBP}*}$ [100 %]	910 ± 189
Protokoll C (vgl. Tabelle E13 Seite 174)	$[\text{PEG}]\text{-Mal}$	249 ± 29
	$[\text{PEG}]\text{-Mal}$ / 100 % 2ME	295 ± 41
	aktivierte $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [10 %]	71 ± 19
	aktivierte $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [50 %]	218 ± 32
	aktivierte $[\text{PEG}]\text{-PEP}^{\text{RhB}}$ [100 %]	986 ± 62
	$[\text{PEG}]\text{-Mal}$ / Protease-Puffer	286 ± 47
	$[\text{PEG}]\text{-Mal}$ / TEV Protease	404 ± 20

Kapitel 6

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. Crespy, M. Bozonnet, M. Meier, **100 Jahre Bakelit: das Material für 1000 Anwendungen**, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3368-3374.
- [2] R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Law, **Production, use, and fate of all plastics ever made**, *Science Advances* **2017**, *3*.
- [3] G. Menges, E. Haberstroh, W. Michaeli, E. Schmachtenberg, in *Menges Werkstoffkunde Kunststoffe: Kunststoffe - Eigenschaften und Anwendungen kurz gefasst*, Carl Hanser Verlag, München [GER], **2011**, pp. 13-30.
- [4] L. A. Canalle, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, **Polypeptide-polymer bioconjugates**, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 329-353.
- [5] A. S. Hoffman, **Bioconjugates of intelligent polymers and recognition proteins for use in diagnostics and affinity separations**, *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1478-1486.
- [6] E. H. C. Bromley, K. Channon, E. Moutevelis, D. N. Woolfson, **Peptide and Protein Building Blocks for Synthetic Biology: From Programming Biomolecules to Self-Organized Biomolecular Systems**, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 38-50.
- [7] D. W. P. M. Löwik, E. H. P. Leunissen, M. van den Heuvel, M. B. Hansen, J. C. M. van Hest, **Stimulus responsive peptide based materials**, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3394-3412.
- [8] J.-M. Lehn, in *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives: Chapter 10 – Perspectives*, 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim [Germany], **1995**, pp. 199-206.
- [9] S. E. Sakiyama-Elbert, J. A. Hubbell, **Functional biomaterials: Design of novel biomaterials**, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2001**, *31*, 183-201.
- [10] G. W. M. Vandermeulen, H.-A. Klok, **Peptide/Protein Hybrid Materials: Enhanced Control of Structure and Improved Performance through Conjugation of Biological and Synthetic Polymers**, *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 383-398.
- [11] P.-F. Caponi, R. V. Ulijn, in *Smart Materials for Drug Delivery: Volume 1: Chapter 9 – Enzyme-responsive Drug-delivery Systems*, 1st ed. (Eds.: C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro), Royal Society of Chemistry, Milton [United Kingdom], **2013**, pp. 232-255.
- [12] Y. M. Abul-Haija, R. V. Ulijn, in *Hydrogels in Cell-Based Therapies: Chapter 6 – Enzyme-Responsive Hydrogels for Biomedical Applications*, 1st ed. (Eds.: C. J. Connon, I. W. Hamley), Royal Society of Chemistry, Milton [United Kingdom], **2014**, pp. 112-134.
- [13] M. Zelzer, R. V. Ulijn, in *Smart Polymers and their Applications: Chapter 6 – Enzyme-responsive polymers: properties, synthesis and applications*, 1st ed. (Eds.: M. R. A. D. Armas, J. S. Román), Woodhead Publishing [Elsevier Inc.], Sawston [United Kingdom] – Waltham [MA, United States] – Kidlington [United Kingdom], **2014**, pp. 166-203.
- [14] P. K. Robinson, **Enzymes: principles and biotechnological applications**, *Essays Biochem.* **2015**, *59*, 1-41.

- [15] V. Castelletto, J. E. McKendrick, I. W. Hamley, U. Olsson, C. Cenker, **PEGylated Amyloid Peptide Nanocontainer Delivery and Release System**, *Langmuir* **2010**, *26*, 11624-11627.
- [16] M. Ehrbar, S. C. Rizzi, R. Hlushchuk, V. Djonov, A. H. Zisch, J. A. Hubbell, F. E. Weber, M. P. Lutolf, **Enzymatic formation of modular cell-instructive fibrin analogs for tissue engineering**, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3856-3866.
- [17] E. A. Phelps, N. Landázuri, P. M. Thulé, W. R. Taylor, A. J. García, **Bioartificial matrices for therapeutic vascularization**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 3323-3328.
- [18] J. J. Moon, J. E. Saik, R. A. Poché, J. E. Leslie-Barbick, S.-H. Lee, A. A. Smith, M. E. Dickinson, J. L. West, **Biomimetic hydrogels with pro-angiogenic properties**, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3840-3847.
- [19] E. B. Peters, N. Christoforou, K. W. Leong, G. A. Truskey, J. L. West, **Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Scaffolds Containing Cell-Adhesive and Protease-Sensitive Peptides Support Microvessel Formation by Endothelial Progenitor Cells**, *Cellular and Molecular Bioengineering* **2016**, *9*, 38-54.
- [20] T. Koga, K. Kitamura, N. Higashi, **Enzymatically triggered self-assembly of poly(ethylene glycol)-attached oligopeptides into well-organized nanofibers**, *Chem. Commun.* **2006**, 4897-4899.
- [21] H. Kühnle, H. G. Börner, **Biotransformation on Polymer–Peptide Conjugates: A Versatile Tool to Trigger Microstructure Formation**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6431-6434.
- [22] H. Kühnle, H. G. Börner, **Biotransformation an Polymer-Peptid-Konjugaten – ein universelles Werkzeug zur Mikrostrukturkontrolle**, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6552-6556.
- [23] P. Wilke, H. G. Börner, **Mussel-Glue Derived Peptide–Polymer Conjugates to Realize Enzyme-Activated Antifouling Coatings**, *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 871-875.
- [24] P. Wilke, N. Helfricht, A. Mark, G. Papastavrou, D. Faivre, H. G. Börner, **A Direct Biocombinatorial Strategy toward Next Generation, Mussel-Glue Inspired Saltwater Adhesives**, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12667-12674.
- [25] S. J. Todd, D. J. Scurr, J. E. Gough, M. R. Alexander, R. V. Ulijn, **Enzyme-Activated RGD Ligands on Functionalized Poly(ethylene glycol) Monolayers: Surface Analysis and Cellular Response**, *Langmuir* **2009**, *25*, 7533-7539.
- [26] F. I. Nollmann, T. Goldbach, N. Berthold, R. Hoffmann, **Controlled Systemic Release of Therapeutic Peptides from PEGylated Prodrugs by Serum Proteases**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7597-7599.
- [27] F. I. Nollmann, T. Goldbach, N. Berthold, R. Hoffmann, **Kontrollierte systemische Freisetzung therapeutischer Peptide aus PEGylierten Prodrugs durch Serumproteasen**, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7747-7750.
- [28] P. R. LeDuc, W. C. Messner, J. P. Wikswo, **How Do Control-Based Approaches Enter into Biology?**, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2011**, *13*, 369-396.
- [29] A. Lazcano, S. L. Miller, **The Origin and Early Evolution of Life: Prebiotic Chemistry, the Pre-RNA World, and Time**, *Cell* **1996**, *85*, 793-798.
- [30] G. F. Joyce, **The antiquity of RNA-based evolution**, *Nature* **2002**, *418*, 214-221.
- [31] S. Mann, **The Origins of Life: Old Problems, New Chemistries**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 155-162.
- [32] P. Forterre, S. Gribaldo, **The origin of modern terrestrial life**, *HFSP J.* **2007**, *1*, 156-168.
- [33] D. Roy, J. N. Cambre, B. S. Sumerlin, **Future perspectives and recent advances in stimuli-responsive materials**, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 278-301.

-
- [34] L. Konieczny, I. Roterman-Konieczna, P. Spólnik, in *Systems Biology: Functional Strategies of Living Organisms: Chapter 1 – The Structure and Function of Living Organisms*, 1st ed., Springer International Publishing, Cham [Switzerland], **2014**, pp. 1-32.
- [35] O. D. Krishna, K. L. Kiick, **Protein- and peptide-modified synthetic polymeric biomaterials**, *Pept. Sci.* **2010**, *94*, 32-48.
- [36] H. G. Börner, J. F. Lutz, in *Polymer Science: A Comprehensive Reference: Chapter 6.15 – Synthetic–Biological Hybrid Polymers: Synthetic Designs, Properties, and Applications*, 1st ed. (Eds.: M. Möller, K. Matyjaszewski), Elsevier, Amsterdam [The Netherlands] – Kidlington [United Kingdom] – Waltham [MA, United States], **2012**, pp. 543-586.
- [37] I. Cobo, M. Li, B. S. Sumerlin, S. Perrier, **Smart hybrid materials by conjugation of responsive polymers to biomacromolecules**, *Nat. Mater.* **2015**, *14*, 143-159.
- [38] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, in *Essential Cell Biology: Chapter 7 – From DNA to protein: how Cells read the Genome*, 3rd ed., Garland Science [Taylor & Francis Group, LLC], New York [NY, United States] – Abingdon [United Kingdom], **2010**, pp. 231-267.
- [39] M. B. Hansen, L. Ruizendaal, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, **Switchable peptides**, *Drug Discov. Today Technol.* **2009**, *6*, e33-e39.
- [40] P. N. Bryan, J. Orban, **Proteins that switch folds**, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 482-488.
- [41] G. Wang, **Human Antimicrobial Peptides and Proteins**, *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 545.
- [42] L. K. Langeberg, J. D. Scott, **Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour**, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 232-244.
- [43] M. Zelzer, S. J. Todd, A. R. Hirst, T. O. McDonald, R. V. Ulijn, **Enzyme responsive materials: design strategies and future developments**, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 11-39.
- [44] PDB ID: 1CQ0. J. H. Lee, E. Bang, K. J. Chae, J. Y. Kim, D. W. Lee, W. Lee (1999), Solution Structure of a New Hypothalamic Neuropeptide, Human Hypocretin-2/Orexin-B, *Eur. J. Biochem.* **266**: 831. Bearbeitet mit The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC (2003-2010).
- [45] PDB ID: 2MZ6. K. S. Usachev, S. V. Efimov, O. A. Kolosova, E. A. Klochkova, A. V. Aganov, V. V. Klochkov (2015), Antimicrobial Peptide Protegrin-3 Adopt an Antiparallel Dimer in the Presence of DPC Micelles: a High-Resolution NMR Study, *J. Biomol. NMR* **62**: 71. Bearbeitet mit The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC (2003-2010).
- [46] PDB ID: 3DA9. M. Nilsson, M. Hamalainen, M. Ivarsson, J. Gottfries, Y. Xue, S. Hansson, R. Isaksson, T. Fex (2009), Compounds Binding to the S2-S3 Pockets of Thrombin, *J. Med. Chem.* **52**: 2708. Bearbeitet mit The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC (2003-2010).
- [47] PDB ID: 1KWI. J. F. Sanchez, F. Hoh, M. P. Strub, A. Aumelas, C. Dumas (2002), Structure of the Cathelicidin Motif of Protegrin-3 Precursor: Structural Insights into the Activation Mechanism of an Antimicrobial Protein, *Structure* **10**: 1363. Bearbeitet mit The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC (2003-2010).
- [48] PDB ID: 2YGD. N. Braun, M. Zacharias, J. Peschek, A. Kastenmueller, J. Zou, M. Hanzlik, M. Haslbeck, J. Rappsilber, J. Buchner, S. Weinkauff (2011), Multiple Molecular Architectures of the Eye Lens Chaperone Alpha Beta-Crystallin Elucidated by a Triple Hybrid Approach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 20491. Bearbeitet mit The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC (2003-2010).
-

- [49] T. Uhlig, T. Kyprianou, F. G. Martinelli, C. A. Oppici, D. Heiligers, D. Hills, X. R. Calvo, P. Verhaert, **The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation**, *EuPA Open Proteomics* **2014**, 4, 58-69.
- [50] V. Brinks, W. Jiskoot, H. Schellekens, **Immunogenicity of Therapeutic Proteins: The Use of Animal Models**, *Pharm. Res.* **2011**, 28, 2379-2385.
- [51] A. K. Shakya, H. Sami, A. Srivastava, A. Kumar, **Stability of responsive polymer-protein bioconjugates**, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35, 459-486.
- [52] A. Muheem, F. Shakeel, M. A. Jahangir, M. Anwar, N. Mallick, G. K. Jain, M. H. Warsi, F. J. Ahmad, **A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives**, *Saudi Pharm. J.* **2016**, 24, 413-428.
- [53] M. Morell, J. Puiggali, **Hybrid Block Copolymers Constituted by Peptides and Synthetic Polymers: An Overview of Synthetic Approaches, Supramolecular Behavior and Potential Applications**, *Polymers (Basel, Switz.)* **2013**, 5, 188-224.
- [54] J. Y. Shu, B. Panganiban, T. Xu, **Peptide-Polymer Conjugates: From Fundamental Science to Application**, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, 64, 631-657.
- [55] J. F. Lutz, H. G. Börner, **Modern trends in polymer bioconjugates design**, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 1-39.
- [56] G. Pasparakis, N. Krasnogor, L. Cronin, B. G. Davis, C. Alexander, **Controlled polymer synthesis-from biomimicry towards synthetic biology**, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 286-300.
- [57] H. A. Klok, **Peptide/Protein-Synthetic Polymer Conjugates: Quo Vadis**, *Macromolecules* **2009**, 42, 7990-8000.
- [58] S. Salmaso, P. Caliceti, in *Peptide and Protein Delivery: Chapter 11 – Peptide and Protein Bioconjugation: A Useful Tool to Improve the Biological Performance of Biotech Drugs*, 1st ed. (Ed.: C. V. d. Walle), Academic Press [Elsevier Inc.], London [United Kingdom] – Burlington [MA, United States] – San Diego [CA, United States], **2011**, pp. 247-290.
- [59] J.-F. Lutz, J.-M. Lehn, E. W. Meijer, K. Matyjaszewski, **From precision polymers to complex materials and systems**, *Nat. Rev. Mater.* **2016**, 1, 16024.
- [60] Y. Cui, F. Liu, X. Li, L. Wang, H. Wang, G. Chen, L. Yuan, J. L. Brash, H. Chen, **Improvement in the Thermal Stability of Pyrophosphatase by Conjugation to Poly(N-isopropylacrylamide): Application to the Polymerase Chain Reaction**, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 21913-21918.
- [61] C. M. Riccardi, K. S. Cole, K. R. Benson, J. R. Ward, K. M. Bassett, Y. Zhang, O. V. Zore, B. Stromer, R. M. Kasi, C. V. Kumar, **Toward “Stable-on-the-Table” Enzymes: Improving Key Properties of Catalase by Covalent Conjugation with Poly(acrylic acid)**, *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1501-1510.
- [62] Z. Zarafshani, T. Obata, J.-F. Lutz, **Smart PEGylation of Trypsin**, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 2130-2135.
- [63] R. Duncan, **The dawning era of polymer therapeutics**, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 347-360.
- [64] F. M. Veronese, G. Pasut, **PEGylation, successful approach to drug delivery**, *Drug Discovery Today* **2005**, 10, 1451-1458.
- [65] G. Pasut, F. M. Veronese, in *Polymer Therapeutics I: PEGylation of Proteins as Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates*, 1st ed. (Eds.: R. Satchi-Fainaro, R. Duncan), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin – Heidelberg [Germany], **2006**, pp. 95-134.
- [66] S. Krishnan, N. Wang, C. K. Ober, J. A. Finlay, M. E. Callow, J. A. Callow, A. Hexemer, K. E. Sohn, E. J. Kramer, D. A. Fischer, **Comparison of the Fouling Release Properties**

- of Hydrophobic Fluorinated and Hydrophilic PEGylated Block Copolymer Surfaces: Attachment Strength of the Diatom *Navicula* and the Green Alga *Ulva***, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1449-1462.
- [67] A. C. Obermeyer, B. D. Olsen, **Synthesis and Application of Protein-Containing Block Copolymers**, *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 101-110.
- [68] P. Espeel, F. E. Du Prez, **"Click"-Inspired Chemistry in Macromolecular Science: Matching Recent Progress and User Expectations**, *Macromolecules* **2015**, *48*, 2-14.
- [69] S. Liu, K. T. Dicker, X. Jia, **Modular and orthogonal synthesis of hybrid polymers and networks**, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5218-5237.
- [70] M. Meißler, S. Wieczorek, N. ten Brummelhuis, H. G. Börner, in *Bio-inspired Polymers: Chapter 1 – Synthetic Aspects of Peptide- and Protein-Polymer Conjugates in the Post-click Era*, 1st ed. (Eds.: N. Bruns, A. F. M. Kilbinger), Royal Society of Chemistry, Cambridge [United Kingdom], **2017**, pp. 1-30.
- [71] S. Dehn, R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, **Synthetic Strategies for the Design of Peptide/Polymer Conjugates**, *Polym. Rev.* **2011**, *51*, 214-234.
- [72] H. G. Börner, in *Controlled/Living Radical Polymerization: Progress in RAFT, DT, NMP & OMRP: Chapter 17 – Bioconjugates of polymers and sequence-defined peptides by reversible addition fragmentation chain transfer radical polymerization*, 1st ed. (Ed.: K. Matyjaszewski), American Chemical Society, Washington [DC, United States], **2009**, pp. 265-278.
- [73] B. S. Lele, H. Murata, K. Matyjaszewski, A. J. Russell, **Synthesis of uniform protein-polymer conjugates**, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3380-3387.
- [74] C. Boyer, V. Bulmus, T. P. Davis, V. Ladmiral, J. Liu, S. Perrier, **Bioapplications of RAFT Polymerization**, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5402-5436.
- [75] M. L. Becker, J. Q. Liu, K. L. Wooley, **Functionalized micellar assemblies prepared via block copolymers synthesized by living free radical polymerization upon peptide-loaded resins**, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 220-228.
- [76] Y. Mei, K. L. Beers, H. C. M. Byrd, D. L. Vanderhart, N. R. Washburn, **Solid-phase ATRP synthesis of peptide-polymer hybrids**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3472-3476.
- [77] B. S. Sumerlin, **Proteins as Initiators of Controlled Radical Polymerization: Grafting-from via ATRP and RAFT**, *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 141-145.
- [78] S. Hansson, V. Trouillet, T. Tischer, A. S. Goldmann, A. Carlmark, C. Barner-Kowollik, E. Malmstrom, **Grafting Efficiency of Synthetic Polymers onto Biomaterials: A Comparative Study of Grafting-from versus Grafting-to**, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 64-74.
- [79] P. Thordarson, B. Le Droumaguet, K. Velonia, **Well-defined protein-polymer conjugates-synthesis and potential applications**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *73*, 243-254.
- [80] T. Tokoroyama, **Discovery of the Michael Reaction**, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 2009-2016.
- [81] G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Techniques: Chapter 17 – Chemoselective Ligation; Bioorthogonal Reagents*, 3rd ed., Academic Press [Elsevier Inc.], London [United Kingdom] – Waltham [MA, United States] – San Diego [CA, United States], **2013**, pp. 757-785.
- [82] S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley, D. V. Santi, **Long-Term Stabilization of Maleimide–Thiol Conjugates**, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 145-152.

- [83] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, **A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [84] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, **Mechanistic investigation of the Staudinger ligation**, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [85] H. A. Klok, M. A. Gauthier, **Peptide/protein-polymer conjugates: synthetic strategies and design concepts**, *Chem. Commun.* **2008**, 2591-2611.
- [86] M. Moser, T. Behnke, C. Hamers-Allin, K. Klein-Hartwig, J. Falkenhagen, U. Resch-Genger, **Quantification of PEG-Maleimide Ligands and Coupling Efficiencies on Nanoparticles with Ellman's Reagent**, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9376-9383.
- [87] H. Hellermann, H. W. Lucas, J. Maul, V. N. R. Pillai, M. Mutter, **Poly(Ethylene Glycol)s Grafted onto Crosslinked Polystyrenes, 2 Multidetachably Anchored Polymer Systems for the Synthesis of Solubilized Peptides**, *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 2603-2617.
- [88] W. Rapp, in *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: Chapter 16 – PEG Grafted Polystyrene Tentacle Polymers: Physico-Chemical Properties and Application in Chemical Synthesis*, 1st ed. (Ed.: G. Jung), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim [Germany], **1996**, pp. 425-464.
- [89] E. Bayer, **Towards the Chemical Synthesis of Proteins**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113-129.
- [90] E. Bayer, **Auf dem Weg zur chemischen Synthese von Proteinen**, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117-133.
- [91] R. B. Merrifield, **Automated Synthesis of Peptides**, *Science* **1965**, *150*, 178-185.
- [92] D. Roy, J. N. Cambre, B. S. Sumerlin, in *Handbook of Stimuli-Responsive Materials: Chapter 2 – Biological- and Field-Responsive Polymers: Expanding Potential in Smart Materials*, 1st ed. (Ed.: M. W. Urban), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim [Germany], **2011**, pp. 27-57.
- [93] G. Chen, A. S. Hoffman, **Preparation and properties of thermoreversible, phase-separating enzyme-oligo(N-isopropylacrylamide) conjugates**, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 509-514.
- [94] O. D. Krishna, K. T. Wiss, T. Luo, D. J. Pochan, P. Theato, K. L. Kiick, **Morphological transformations in a dually thermoresponsive coil-rod-coil bioconjugate**, *Soft Matter* **2012**, *8*, 3832-3840.
- [95] K. J. Mackenzie, M. B. Francis, **Recyclable Thermoresponsive Polymer–Cellulose Bioconjugates for Biomass Depolymerization**, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 293-300.
- [96] J. Hentschel, E. Krause, H. G. Börner, **Switch-Peptides to Trigger the Peptide Guided Assembly of Poly(ethylene oxide) - Peptide Conjugates into Tape Structures**, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7722-7723.
- [97] J. Hentschel, M. G. J. ten Cate, H. G. Börner, **Peptide-guided organization of peptide-polymer conjugates: Expanding the approach from oligo- to polymers**, *Macromolecules* **2007**, *40*, 9224-9232.
- [98] P. Ponnumallayan, C. J. Fee, **Reversible and Rapid pH-Regulated Self-Assembly of a Poly(ethylene glycol)–Peptide Bioconjugate**, *Langmuir* **2014**, *30*, 14250-14256.
- [99] T. Shimoboji, Z. L. Ding, P. S. Stayton, A. S. Hoffman, **Photoswitching of Ligand Association with a Photoresponsive Polymer–Protein Conjugate**, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 915-919.

- [100] T. Shimoboji, E. Larenas, T. Fowler, S. Kulkarni, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, **Photoresponsive polymer-enzyme switches**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16592-16596.
- [101] V. K. Kotharangannagari, A. Sánchez-Ferrer, J. Ruokolainen, R. Mezzenga, **Photoresponsive Reversible Aggregation and Dissolution of Rod-Coil Polypeptide Diblock Copolymers**, *Macromolecules* **2011**, *44*, 4569-4573.
- [102] S. Zalipsky, N. Mullah, C. Engbers, M. U. Hutchins, R. Kiwan, **Thiolytically Cleavable Dithiobenzyl Urethane-Linked Polymer-Protein Conjugates as Macromolecular Prodrugs: Reversible PEGylation of Proteins**, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1869-1878.
- [103] K. N. Plunkett, K. L. Berkowski, J. S. Moore, **Chymotrypsin Responsive Hydrogel: Application of a Disulfide Exchange Protocol for the Preparation of Methacrylamide Containing Peptides**, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 632-637.
- [104] S. Wieczorek, S. Vigne, T. Masini, D. Ponader, L. Hartmann, A. K. H. Hirsch, H. G. Börner, **Combinatorial Screening for Specific Drug Solubilizers with Switchable Release Profiles**, *Macromol. Biosci.* **2015**, *15*, 82-89.
- [105] J. H. Collier, P. B. Messersmith, **Self-Assembling Polymer-Peptide Conjugates: Nanostructural Tailoring**, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 907-910.
- [106] F. Chécot, J. Rodríguez-Hernández, Y. Gnanou, S. Lecommandoux, **Responsive micelles and vesicles based on polypeptide diblock copolymers**, *Polym. Adv. Technol.* **2006**, *17*, 782-785.
- [107] R. I. Kühnle, H. G. Börner, **Calcium Ions to Remotely Control the Reversible Switching of Secondary and Quaternary Structures in Bioconjugates**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4499-4502.
- [108] R. I. Kühnle, H. G. Börner, **Calciumionen als Schalter zur reversiblen Steuerung der Sekundär- und Quartärstrukturen in Biokonjugaten**, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4592-4595.
- [109] R. I. Kühnle, D. Gebauer, H. G. Börner, **Calcium ions as bioinspired triggers to reversibly control the coil-to-helix transition in peptide-polymer conjugates**, *Soft Matter* **2011**, *7*, 9616-9619.
- [110] X. R. Zhou, R. Ge, G. F. Li, L. Chen, T. W. Tan, X. Wang, S. Z. Luo, **Multiple Responsive Polymer-Peptide Bioconjugate**, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2015**, *21*, 497-502.
- [111] J. Couet, M. Biesalski, **Surface-Initiated ATRP of N-Isopropylacrylamide from Initiator-Modified Self-Assembled Peptide Nanotubes**, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7258-7268.
- [112] Y. Qi, A. Chilkoti, **Growing polymers from peptides and proteins: a biomedical perspective**, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 266-276.
- [113] M. L. Becker, J. Liu, K. L. Wooley, **Functionalized Micellar Assemblies Prepared via Block Copolymers Synthesized by Living Free Radical Polymerization upon Peptide-Loaded Resins**, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 220-228.
- [114] M. Y. Arica, H. Yavuz, S. Patir, A. Denizli, **Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor**, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *11*, 127-138.
- [115] T. Bahar, S. S. Çelebi, **Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR)**, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 28-33.
- [116] S. Y. Cheng, J. Gross, A. Sambanis, **Hybrid pancreatic tissue substitute consisting of recombinant insulin-secreting cells and glucose-responsive material**, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87*, 863-873.

- [117] Z.-R. Lu, P. Kopečková, J. Kopeček, **Antigen Responsive Hydrogels Based on Polymerizable Antibody Fab' Fragment**, *Macromol. Biosci.* **2003**, *3*, 296-300.
- [118] D. Roy, B. J. Nehilla, J. J. Lai, P. S. Stayton, **Stimuli-Responsive Polymer-Antibody Conjugates via RAFT and Tetrafluorophenyl Active Ester Chemistry**, *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 132-136.
- [119] L. D. Zarzar, J. Aizenberg, **Stimuli-Responsive Chemomechanical Actuation: A Hybrid Materials Approach**, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 530-539.
- [120] J. Fan, J. Zou, X. He, F. Zhang, S. Zhang, J. E. Raymond, K. L. Wooley, **Tunable mechano-responsive organogels by ring-opening copolymerizations of N-carboxyanhydrides**, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 141-150.
- [121] R. Hoogenboom, in *Smart Polymers and their Applications: Chapter 2 – Temperature-responsive polymers: properties, synthesis and applications*, 1st ed. (Eds.: M. R. A. D. Armas, J. S. Román), Woodhead Publishing [Elsevier Inc.], Sawston [United Kingdom] – Waltham [MA, United States] – Kidlington [United Kingdom], **2014**, pp. 15-44.
- [122] F. Reyes-Ortega, in *Smart Polymers and their Applications: Chapter 3 – pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications*, 1st ed. (Eds.: M. R. A. D. Armas, J. S. Román), Woodhead Publishing [Elsevier Inc.], Sawston [United Kingdom] – Waltham [MA, United States] – Kidlington [United Kingdom], **2014**, pp. 45-92.
- [123] A. S. Hoffman, P. S. Stayton, V. Bulmus, G. Chen, J. Chen, C. Cheung, A. Chilkoti, Z. Ding, L. Dong, R. Fong, C. A. Lackey, C. J. Long, M. Miura, J. E. Morris, N. Murthy, Y. Nabeshima, T. G. Park, O. W. Press, T. Shimoboji, S. Shoemaker, H. J. Yang, N. Monji, R. C. Nowinski, C. A. Cole, J. H. Priest, J. M. Harris, K. Nakamae, T. Nishino, T. Miyata, **Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins**, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 577-586.
- [124] A. S. Hoffman, P. S. Stayton, **Conjugates of stimuli-responsive polymers and proteins**, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 922-932.
- [125] M. Zrinyi, **Magnetic-field-sensitive polymer gels**, *Trends Polym. Sci.* **1997**, *5*, 280-285.
- [126] E. G. Kelley, J. N. L. Albert, M. O. Sullivan, I. I. I. T. H. Epps, **Stimuli-responsive copolymer solution and surface assemblies for biomedical applications**, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7057-7071.
- [127] J. Tailhades, N. A. Patil, M. A. Hossain, J. D. Wade, **Intramolecular acyl transfer in peptide and protein ligation and synthesis**, *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 139-147.
- [128] R. Klajn, **Spiropyran-based dynamic materials**, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 148-184.
- [129] R. V. Ulijn, **Enzyme-responsive materials: a new class of smart biomaterials**, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2217-2225.
- [130] T.-H. Ku, M.-P. Chien, M. P. Thompson, R. S. Sinkovits, N. H. Olson, T. S. Baker, N. C. Gianneschi, **Controlling and Switching the Morphology of Micellar Nanoparticles with Enzymes**, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8392-8395.
- [131] L. S. Moreira Teixeira, J. Feijen, C. A. van Blitterswijk, P. J. Dijkstra, M. Karperien, **Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering**, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1281-1290.
- [132] J. M. Hu, G. Q. Zhang, S. Y. Liu, **Enzyme-responsive polymeric assemblies, nanoparticles and hydrogels**, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5933-5949.
- [133] S. Lobedanz, T. Damhus, T. V. Borchert, T. T. Hansen, H. Lund, W. Lai, M. Lin, M. Leclerc, O. Kirk, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology: Enzymes in Industrial Biotechnology*, 3rd ed. (Eds.: A. Seidel, M. Bickford), John Wiley & Sons, **2016**.

- [134] J. R. Tauro, B.-S. Lee, S. S. Lateef, R. A. Gemeinhart, **Matrix metalloprotease selective peptide substrates cleavage within hydrogel matrices for cancer chemotherapy activation**, *Peptides* **2008**, 29, 1965-1973.
- [135] A. A. Aimetti, A. J. Machen, K. S. Anseth, **Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by thiol-ene photopolymerization for enzyme-responsive protein delivery**, *Biomaterials* **2009**, 30, 6048-6054.
- [136] D. S. Chu, D. L. Sellers, M. J. Bocek, A. E. Fishedick, P. J. Horner, S. H. Pun, **MMP9-sensitive polymers mediate environmentally-responsive bivalirudin release and thrombin inhibition**, *Biomater. Sci.* **2015**, 3, 41-45.
- [137] M. E. R. Jones, P. B. Messersmith, **Facile coupling of synthetic peptides and peptide-polymer conjugates to cartilage via transglutaminase enzyme**, *Biomaterials* **2007**, 28, 5215-5224.
- [138] J. J. Sperinde, L. G. Griffith, **Synthesis and Characterization of Enzymatically-Cross-Linked Poly(ethylene glycol) Hydrogels**, *Macromolecules* **1997**, 30, 5255-5264.
- [139] J. L. West, J. A. Hubbell, **Polymeric Biomaterials with Degradation Sites for Proteases Involved in Cell Migration**, *Macromolecules* **1999**, 32, 241-244.
- [140] J. W. Keillor, C. M. Clouthier, K. Y. P. Apperley, A. Akbar, A. Mulani, **Acyl transfer mechanisms of tissue transglutaminase**, *Bioorg. Chem.* **2014**, 57, 186-197.
- [141] C. López-Otín, J. S. Bond, **Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease**, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 30433-30437.
- [142] C. E. Brinckerhoff, L. M. Matrisian, **Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince**, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 207-214.
- [143] F. J. Castellino, in *Handbook of Proteolytic Enzymes: Chapter 648 – Plasmin*, 3rd ed. (Eds.: N. D. Rawlings, G. Salvesen), Academic Press [Elsevier Ltd.], London [United Kingdom] – Waltham [MA, United States] – San Diego [CA, United States], **2013**, pp. 2958-2968.
- [144] S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, **Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif**, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 246-250.
- [145] P. T. W. Cohen, in *Handbook of Cell Signaling: Chapter 85 – Phosphatase Families Dephosphorylating Serine and Threonine Residues in Proteins*, 2nd ed. (Eds.: R. A. Bradshaw, E. A. Dennis), Academic Press [Elsevier Inc.], Burlington [MA, United States] – London [United Kingdom] – San Diego [CA, United States] – New York [NY, United States], **2010**, pp. 659-675.
- [146] D. Knappe, S. Piantavigna, A. Hansen, A. Mechler, A. Binas, O. Nolte, L. L. Martin, R. Hoffmann, **Oncocin (VDKPPYLPRPRPPRIYNR-NH₂): A Novel Antibacterial Peptide Optimized against Gram-Negative Human Pathogens**, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5240-5247.
- [147] P. Czihal, D. Knappe, S. Fritsche, M. Zahn, N. Berthold, S. Piantavigna, U. Müller, S. Van Dorpe, N. Herth, A. Binas, G. Köhler, B. De Spiegeleer, L. L. Martin, O. Nolte, N. Sträter, G. Alber, R. Hoffmann, **Api88 Is a Novel Antibacterial Designer Peptide To Treat Systemic Infections with Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens**, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 1281-1291.
- [148] F. Chua, G. J. Laurent, **Neutrophil Elastase**, *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2006**, 3, 424-427.
- [149] J. A. Mótyán, F. Tóth, J. Tózsér, **Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology**, *Biomolecules* **2013**.
- [150] D. S. Waugh, **An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags**, *Protein Expr. Purif.* **2011**, 80, 283-293.
- [151] R. J. Jenny, K. G. Mann, R. L. Lundblad, **A Critical Review of the Methods for Cleavage of Fusion Proteins with Thrombin and Factor Xa**, *Protein Expr. Purif.* **2003**, 31, 1-11.

- [152] C. L. Young, Z. T. Britton, A. S. Robinson, **Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications**, *Biotechnol. J.* **2012**, 7, 620-634.
- [153] E. R. LaVallie, J. M. McCoy, D. B. Smith, P. Riggs, in *Current Protocols in Molecular Biology: UNIT 16.4B – Enzymatic and Chemical Cleavage of Fusion Proteins* (Eds.: F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, K. Struhl), John Wiley & Sons, New York [NY, United States], **1994**.
- [154] T. Hosfield, Q. Lu, **Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)(4)Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein (vol 269, pg 10, 1999)**, *Anal. Biochem.* **1999**, 271, 121-121.
- [155] W. G. Dougherty, J. C. Carrington, S. M. Cary, T. D. Parks, **Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site**, *EMBO J.* **1988**, 7, 1281-1287.
- [156] W. G. Dougherty, T. Dawn Parks, **Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays**, *Virology* **1989**, 172, 145-155.
- [157] R. B. Kapust, J. Tozser, T. D. Copeland, D. S. Waugh, **The P1 ' specificity of tobacco etch virus protease**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 294, 949-955.
- [158] D. S. Waugh, R. B. Kapust, **Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease**, *Protein Expr. Purif.* **2000**, 19, 312-318.
- [159] S. Nallamsetty, R. B. Kapust, J. Tözsér, S. Cherry, J. E. Tropea, T. D. Copeland, D. S. Waugh, **Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro**, *Protein Expr. Purif.* **2004**, 38, 108-115.
- [160] W. G. Dougherty, T. D. Parks, **Posttranslational Processing of the Tobacco Etch Virus 49-kDa Small Nuclear Inclusion Polyprotein - Identification of an Internal Cleavage Site and Delimitation of VPg and Proteinase Domains**, *Virology* **1991**, 183, 449-456.
- [161] L. D. Cabrita, D. Gilis, A. L. Robertson, Y. Dehouck, M. Rooman, S. P. Bottomley, **Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design**, *Protein Sci.* **2007**, 16, 2360-2367.
- [162] R. B. Kapust, J. Tozser, J. D. Fox, D. E. Anderson, S. Cherry, T. D. Copeland, D. S. Waugh, **Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency**, *Protein Eng.* **2001**, 14, 993-1000.
- [163] J. Phan, A. Zdanov, A. G. Evdokimov, J. E. Tropea, H. K. Peters, R. B. Kapust, M. Li, A. Wlodawer, D. S. Waugh, **Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease**, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 50564-50572.
- [164] PDB ID: 1LVM. J. Phan, A. Zdanov, A. G. Evdokimov, J. E. Tropea, H. K. Peters III, R. B. Kapust, M. Li, A. Wlodawer, D S. Waugh (2002), Structural Basis for the Substrate Specificity of Tobacco Etch Virus Protease, *J. Biol. Chem.* 277: 50564. Bearbeitet mit The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC (2003-2010).
- [165] M. Rzychon, D. Chmiel, J. Stec-Niemczyk, **Modes of inhibition of cysteine proteases**, *Acta Biochim. Pol.* **2004**, 51, 861-873.
- [166] T. Shafee, P. Gatti-Lafranconi, R. Minter, F. Hollfelder, **Handicap-Recover Evolution Leads to a Chemically Versatile, Nucleophile-Permissive Protease**, *ChemBioChem* **2015**, 16, 1866-1869.
- [167] J. A. Doudna, L. J. Lucast, R. T. Batey, **Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease**, *Biotechniques* **2001**, 30, 544-550.

- [168] W. G. Dougherty, T. D. Parks, S. M. Cary, J. F. Bazan, R. J. Fletterick, **Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase**, *Virology* **1989**, *172*, 302-310.
- [169] C. Bello, K. Farbiarz, J. F. Moller, C. F. W. Becker, T. Schwientek, **A quantitative and site-specific chemoenzymatic glycosylation approach for PEGylated MUC1 peptides**, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1634-1641.
- [170] H.-C. Flemming, in *Biofilm Highlights: Microbial Biofouling: Unsolved Problems, Insufficient Approaches, and Possible Solutions*, 1st ed. (Eds.: H.-C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin – Heidelberg [Germany], **2011**, pp. 81-109.
- [171] L.-C. Xu, C. A. Siedlecki, in *Biointerfaces: Where Material Meets Biology: Chapter 13 – Bacterial Adhesion and Interaction with Biomaterial Surfaces*, 1st ed. (Eds.: D. Hutmacher, W. Chrzanowski), The Royal Society of Chemistry, Milton [United Kingdom], **2015**, pp. 363-398.
- [172] I. Francolini, G. Donelli, F. Crisante, V. Taresco, A. Piozzi, in *Biofilm-based Healthcare-associated Infections: Volume II: Chapter 7 – Antimicrobial Polymers for Anti-biofilm Medical Devices: State-of-Art and Perspectives*, 1st ed. (Ed.: G. Donelli), Springer International Publishing AG, Cham [Switzerland], **2015**, pp. 93-117.
- [173] Q. Wei, T. Becherer, S. Angioletti-Uberti, J. Dzubiella, C. Wischke, A. T. Neffe, A. Lendlein, M. Ballauff, R. Haag, **Protein Interactions with Polymer Coatings and Biomaterials**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8004-8031.
- [174] Q. Wei, T. Becherer, S. Angioletti-Uberti, J. Dzubiella, C. Wischke, A. T. Neffe, A. Lendlein, M. Ballauff, R. Haag, **Wechselwirkungen von Proteinen mit Polymerbeschichtungen und Biomaterialien**, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8138-8169.
- [175] I. Banerjee, R. C. Pangule, R. S. Kane, **Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms**, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 690-718.
- [176] F. Siedenbiedel, J. C. Tiller, **Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles**, *Polymers (Basel, Switz.)* **2012**, *4*, 46-71.
- [177] S. R. Meyers, M. W. Grinstaff, **Biocompatible and Bioactive Surface Modifications for Prolonged In Vivo Efficacy**, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1615-1632.
- [178] J. Hasan, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, **Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials**, *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 295-304.
- [179] R. Kumar, H. Münstedt, **Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites**, *Biomaterials* **2005**, *26*, 2081-2088.
- [180] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, **Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver**, *Nanoscale* **2013**, *5*, 7328-7340.
- [181] A. Guyomard, E. Dé, T. Jouenne, J.-J. Malandain, G. Muller, K. Glinel, **Incorporation of a Hydrophobic Antibacterial Peptide into Amphiphilic Polyelectrolyte Multilayers: A Bioinspired Approach to Prepare Biocidal Thin Coatings**, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 758-765.
- [182] J. C. Tiller, in *Bioactive Surfaces: Antimicrobial Surfaces*, 1st ed. (Eds.: G. H. Börner, J.-F. Lutz), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin - Heidelberg [Germany], **2011**, pp. 193-217.
- [183] M. Cloutier, D. Mantovani, F. Rosei, **Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities**, *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 637-652.

- [184] J. Shi, Y. Liu, Y. Wang, J. Zhang, S. Zhao, G. Yang, **Biological and immunotoxicity evaluation of antimicrobial peptide-loaded coatings using a layer-by-layer process on titanium**, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16336.
- [185] F. Costa, I. F. Carvalho, R. C. Montelaro, P. Gomes, M. C. L. Martins, **Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces**, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1431-1440.
- [186] G. T. Qin, A. Lopez, C. Santos, A. M. McDermott, C. Z. Cai, **Antimicrobial peptide LL-37 on surfaces presenting carboxylate anions**, *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 771-778.
- [187] S. M. Olsen, L. T. Pedersen, M. H. Laursen, S. Kiil, K. Dam-Johansen, **Enzyme-based antifouling coatings: a review**, *Biofouling* **2007**, *23*, 369-383.
- [188] J. B. Kristensen, R. L. Meyer, B. S. Laursen, S. Shipovskov, F. Besenbacher, C. H. Poulsen, **Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement**, *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 471-481.
- [189] O. Rzhepishevskaya, S. Hakobyan, R. Ruhal, J. Gautrot, D. Barbero, M. Ramstedt, **The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and biofilm architecture**, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 589-602.
- [190] M. Lejars, A. Margaillan, C. Bressy, **Fouling Release Coatings: A Nontoxic Alternative to Biocidal Antifouling Coatings**, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4347-4390.
- [191] W. A. Zisman, in *Contact Angle, Wettability, and Adhesion: Chapter 1 – Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution*, 1st ed. (Ed.: F. M. Fowkes), American Chemical Society, Washington [DC, United States], **1964**, pp. 1-51.
- [192] R. F. Brady Jr, **A fracture mechanical analysis of fouling release from nontoxic antifouling coatings**, *Prog. Org. Coat.* **2001**, *43*, 188-192.
- [193] V. K. Vendra, L. Wu, S. Krishnan, in *Nanotechnologies for the Life Sciences: Chapter 1 – Polymer Thin Films for Biomedical Applications* (Ed.: C. S. S. R. Kumar), Wiley-VCH Verlag, Weinheim [Germany], **2011**.
- [194] C. R. Emmenegger, E. Brynda, T. Riedel, Z. Sedlakova, M. Houska, A. B. Alles, **Interaction of Blood Plasma with Antifouling Surfaces**, *Langmuir* **2009**, *25*, 6328-6333.
- [195] F. J. Xu, K. G. Neoh, E. T. Kang, **Bioactive surfaces and biomaterials via atom transfer radical polymerization**, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 719-761.
- [196] F. Brétagne, A. Valsesia, G. Ceccone, P. Colpo, D. Gilliland, L. Ceriotti, M. Hasiwa, F. Rossi, **Surface Functionalization and Patterning Techniques to Design Interfaces for Biomedical and Biosensor Applications**, *Plasma Processes Polym.* **2006**, *3*, 443-455.
- [197] T. Jacobs, R. Morent, N. De Geyter, P. Dubruel, C. Leys, **Plasma Surface Modification of Biomedical Polymers: Influence on Cell-Material Interaction**, *Plasma Chem. Plasma Process.* **2012**, *32*, 1039-1073.
- [198] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. De Gennes, **Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide**, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149-158.
- [199] A. Ulman, **Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers**, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533-1554.
- [200] K. Prime, G. Whitesides, **Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces**, *Science* **1991**, *252*, 1164-1167.
- [201] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, **Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology**, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.
- [202] X. Khoo, P. Hamilton, G. A. O'Toole, B. D. Snyder, D. J. Kenan, M. W. Grinstaff, **Directed Assembly of PEGylated-Peptide Coatings for Infection-Resistant Titanium Metal**, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10992-10997.

-
- [203] X. Khoo, G. A. O'Toole, S. A. Nair, B. D. Snyder, D. J. Kenan, M. W. Grinstaff, **Staphylococcus aureus resistance on titanium coated with multivalent PEGylated-peptides**, *Biomaterials* **2010**, *31*, 9285-9292.
- [204] D. F. Williams, in *Titanium in Medicine: Chapter 2 – Titanium for Medical Applications*, 1st ed. (Eds.: D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin [Germany], **2001**, pp. 13-24.
- [205] M. Balazic, J. Kopac, M. J. Jackson, W. Ahmed, **Review: titanium and titanium alloy applications in medicine**, *Int. J. Nano Biomater.* **2007**, *1*, 3-34.
- [206] S. Tosatti, S. M. D. Paul, A. Askendal, S. VandeVondele, J. A. Hubbell, P. Tengvall, M. Textor, **Peptide functionalized poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium: resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma**, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4949-4958.
- [207] G. L. Kenausis, J. Vörös, D. L. Elbert, N. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J. A. Hubbell, N. D. Spencer, **Poly(l-lysine)-g-Poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Attachment Mechanism and Effects of Polymer Architecture on Resistance to Protein Adsorption**, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3298-3309.
- [208] J. H. Waite, M. L. Tanzer, **Polyphenolic Substance of *Mytilus edulis*: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline**, *Science* **1981**, *212*, 1038-1040.
- [209] H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, **Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings**, *Science* **2007**, *318*, 426-430.
- [210] B. P. Lee, P. B. Messersmith, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, **Mussel-Inspired Adhesives and Coatings**, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41*, 99-132.
- [211] J. L. Dalsin, B.-H. Hu, B. P. Lee, P. B. Messersmith, **Mussel Adhesive Protein Mimetic Polymers for the Preparation of Nonfouling Surfaces**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4253-4258.
- [212] J. L. Dalsin, L. Lin, S. Tosatti, J. Vörös, M. Textor, P. B. Messersmith, **Protein Resistance of Titanium Oxide Surfaces Modified by Biologically Inspired mPEG-DOPA**, *Langmuir* **2005**, *21*, 640-646.
- [213] A. R. Statz, R. J. Meagher, A. E. Barron, P. B. Messersmith, **New Peptidomimetic Polymers for Antifouling Surfaces**, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7972-7973.
- [214] H. G. Silverman, F. F. Roberto, **Understanding Marine Mussel Adhesion**, *Mar. Biotechnol.* **2007**, *9*, 661-681.
- [215] K. Marumo, J. H. Waite, **Optimization of hydroxylation of tyrosine and tyrosine-containing peptides by mushroom tyrosinase**, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1986**, *872*, 98-103.
- [216] J. F. Smothers, S. Henikoff, P. Carter, **Affinity Selection from Biological Libraries**, *Science* **2002**, *298*, 621-622.
- [217] U. Kriplani, B. K. Kay, **Selecting peptides for use in nanoscale materials using phage-displayed combinatorial peptide libraries**, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 470-475.
- [218] U. O. S. Seker, H. V. Demir, **Material Binding Peptides for Nanotechnology**, *Molecules* **2011**, *16*, 1426-1451.
- [219] K. A. Günay, H.-A. Klok, **Identification of Soft Matter Binding Peptide Ligands Using Phage Display**, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2002-2015.
- [220] C. Falciani, L. Lozzi, A. Pini, L. Bracci, **Bioactive Peptides from Libraries**, *Chem. Biol. (Oxford, U. K.)* **2005**, *12*, 417-426.
- [221] T. Hanawa, **Reconstruction and regeneration of surface oxide film on metallic materials in biological environments**, *Corros. Rev.* **2003**, *21*, 161-181.
-

- [222] F. H. Jones, **Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials**, *Surf. Sci. Rep.* **2001**, 42, 79-205.
- [223] M. Kosmulski, **pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach**, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 337, 439-448.
- [224] A. D. Roddick-Lanzilotta, P. A. Connor, A. J. McQuillan, **An in situ infrared spectroscopic study of the adsorption of lysine to TiO₂ from an aqueous solution**, *Langmuir* **1998**, 14, 6479-6484.
- [225] H. Chen, X. Su, K.-G. Neoh, W.-S. Choe, **QCM-D Analysis of Binding Mechanism of Phage Particles Displaying a Constrained Heptapeptide with Specific Affinity to SiO₂ and TiO₂**, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 4872-4879.
- [226] M. B. Dickerson, S. E. Jones, Y. Cai, G. Ahmad, R. R. Naik, N. Kröger, K. H. Sandhage, **Identification and Design of Peptides for the Rapid, High-Yield Formation of Nanoparticulate TiO₂ from Aqueous Solutions at Room Temperature**, *Chem. Mater.* **2008**, 20, 1578-1584.
- [227] Y. Fang, N. Poulsen, M. B. Dickerson, Y. Cai, S. E. Jones, R. R. Naik, N. Kroger, K. H. Sandhage, **Identification of peptides capable of inducing the formation of titania but not silica via a subtractive bacteriophage display approach**, *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 3871-3875.
- [228] H. Chen, X. Su, K.-G. Neoh, W.-S. Choe, **Context-Dependent Adsorption Behavior of Cyclic and Linear Peptides on Metal Oxide Surfaces**, *Langmuir* **2009**, 25, 1588-1593.
- [229] Y. Liu, J. Mao, B. Zhou, W. Wei, S. Gong, **Peptide aptamers against titanium-based implants identified through phage display**, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2010**, 21, 1103-1107.
- [230] S. Y. C. Tong, L. F. Chen, V. G. Fowler, **Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for Staphylococcus aureus: what is the clinical relevance?**, *Semin. Immunopathol.* **2012**, 34, 185-200.
- [231] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Dornedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, **Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10472-10498.
- [232] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Dornedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, **Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip**, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 10622-10650.
- [233] K. I. Sano, K. Shiba, **A hexapeptide motif that electrostatically binds to the surface of titanium**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14234-14235.
- [234] K. I. Sano, H. Sasaki, K. Shiba, **Specificity and biomineralization activities of Ti-binding peptide-1 (TBP-1)**, *Langmuir* **2005**, 21, 3090-3095.
- [235] T. Hayashi, K.-I. Sano, K. Shiba, Y. Kumashiro, K. Iwahori, I. Yamashita, M. Hara, **Mechanism Underlying Specificity of Proteins Targeting Inorganic Materials**, *Nano Lett.* **2006**, 6, 515-519.
- [236] P. A. Mirau, R. R. Naik, P. Gehring, **Structure of Peptides on Metal Oxide Surfaces Probed by NMR**, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 18243-18248.
- [237] M. C. Dixon, **Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions**, *J. Biomol. Tech.* **2008**, 19, 151-158.
- [238] R. E. Speight, M. A. Cooper, **A Survey of the 2010 Quartz Crystal Microbalance Literature**, *J. Mol. Recognit.* **2012**, 25, 451-473.

- [239] K. A. Marx, **Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface**, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1099-1120.
- [240] B. Becker, M. A. Cooper, **A survey of the 2006-2009 quartz crystal microbalance biosensor literature**, *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24*, 754-787.
- [241] C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault, **Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications**, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 663-670.
- [242] J. L. Jordan, E. J. Fernandez, **QCM-D Sensitivity to Protein Adsorption Reversibility**, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 837-842.
- [243] G. Sauerbrey, **Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung**, *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206-222.
- [244] H.-C. Flemming, J. Wingender, **The biofilm matrix**, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623-633.
- [245] M. Rodahl, F. Höök, A. Krozer, P. Brzezinski, B. Kasemo, **Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments**, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66*, 3924-3930.
- [246] M. Rodahl, B. Kasemo, **A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance**, *Rev. Sci. Instrum.* **1996**, *67*, 3238-3241.
- [247] M. Rodahl, F. Höök, B. Kasemo, **QCM Operation in Liquids: An Explanation of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity**, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2219-2227.
- [248] M. Rodahl, F. Höök, C. Fredriksson, C. A. Keller, A. Krozer, P. Brzezinski, M. Voinova, B. Kasemo, **Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion**, *Faraday Discuss.* **1997**, *107*, 229-246.
- [249] F. Höök, B. Kasemo, T. Nylander, C. Fant, K. Sott, H. Elwing, **Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study**, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5796-5804.
- [250] M. V. Voinova, M. Jonson, B. Kasemo, **'Missing mass' effect in biosensor's QCM applications**, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 835-841.
- [251] S. X. Liu, J. T. Kim, **Application of Kelvin-Voigt Model in Quantifying Whey Protein Adsorption on Polyethersulfone Using QCM-D**, *JALA* **2009**, *14*, 213-220.
- [252] M. Leahy, K. Thompson, H. Zafar, S. Alexandrov, M. Foley, C. O'Flatharta, P. Dockery, **Functional imaging for regenerative medicine**, *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, 57.
- [253] D. J. Müller, Y. F. Dufrêne, **Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology**, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 261-269.
- [254] J. Erath, S. Schmidt, A. Fery, **Characterization of adhesion phenomena and contact of surfaces by soft colloidal probe AFM**, *Soft Matter* **2010**, *6*, 1432-1437.
- [255] A. S. G. Curtis, **THE MECHANISM OF ADHESION OF CELLS TO GLASS - A Study by Interference Reflection Microscopy**, *J. Cell Biol.* **1964**, *20*, 199-215.
- [256] K. K. Liu, **Deformation behaviour of soft particles: a review**, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2006**, *39*, R189-R199.
- [257] D. Pussak, M. Behra, S. Schmidt, L. Hartmann, **Synthesis and functionalization of poly(ethylene glycol) microparticles as soft colloidal probes for adhesion energy measurements**, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1664-1672.

- [258] D. Pussak, D. Ponader, S. Mosca, S. V. Ruiz, L. Hartmann, S. Schmidt, **Mechanical Carbohydrate Sensors Based on Soft Hydrogel Particles**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6084-6087.
- [259] D. Pussak, D. Ponader, S. Mosca, S. V. Ruiz, L. Hartmann, S. Schmidt, **Weiche Hydrogelpartikel als mechanische Kohlenhydratsensoren**, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6200-6203.
- [260] S. Schmidt, A. Reinecke, F. Wojcik, D. Pussak, L. Hartmann, M. J. Harrington, **Metal-Mediated Molecular Self-Healing in Histidine-Rich Mussel Peptides**, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1644-1652.
- [261] S. Martin, H. Wang, L. Hartmann, T. Pompe, S. Schmidt, **Quantification of protein-materials interaction by soft colloidal probe spectroscopy**, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 3014-3018.
- [262] S. Schmidt, H. Wang, D. Pussak, S. Mosca, L. Hartmann, **Probing multivalency in ligand-receptor-mediated adhesion of soft, biomimetic interfaces**, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 720-729.
- [263] K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts, **Surface Energy and the Contact of Elastic Solids**, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1971**, *324*, 301-313.
- [264] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, **Chemical Strategies for Generating Protein Biochips**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618-9647.
- [265] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, **Chemische Verfahren zur Herstellung von Proteinbiochips**, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762-9792.
- [266] S. Martin, H. Wang, T. Rathke, U. Anderegg, S. Möller, M. Schnabelrauch, T. Pompe, S. Schmidt, **Polymer hydrogel particles as biocompatible AFM probes to study CD44/hyaluronic acid interactions on cells**, *Polymer* **2016**, *102*, 342-349.
- [267] M. Meißler, A. Taden, H. G. Börner, **Enzyme-Triggered Antifouling Coatings: Switching Bioconjugate Adsorption via Proteolytically Cleavable Interfering Domains**, *ACS Macro Lett.* **2016**, 583-587.
- [268] D. L. T. Hayes, P. Pilo, **Program sednterp: Sedimentation Interpretation Program**, *Alliance Protein Laboratoreis*, Thousand Oaks, CA, 1995.
- [269] Homepage EURx Ltd. (Poland) verfügbar unter: <http://www.eurx.com.pl/product/174/zoom/index.html#> [zuletzt abgerufen am 27.08.2016].
- [270] S. P. Jordan, J. Zugay, P. L. Darke, L. C. Kuo, **Activity and dimerization of human immunodeficiency virus protease as a function of solvent composition and enzyme concentration**, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20028-20032.
- [271] B. L. Bray, **Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis**, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 587-593.
- [272] M.-I. Aguilar, in *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols: Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, 1st ed. (Ed.: M.-I. Aguilar), Humana Press, Totowa [NJ], United States], **2004**, pp. 9-22.
- [273] D. L. Crimmins, S. M. Mische, N. D. Denslow, in *Current Protocols in Protein Science: UNIT 11.4 – Chemical Cleavage of Proteins in Solution* (Eds.: J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, P. T. Wingfield), John Wiley & Sons, Hoboken [NJ], United States], **2005**.
- [274] H. S. Duewel, J. F. Honek, **CNBr/Formic Acid Reactions of Methionine- and Trifluoromethionine-Containing Lambda Lysozyme: Probing Chemical and Positional Reactivity and Formylation Side Reactions by Mass Spectrometry**, *J. Protein Chem.* **1998**, *17*, 337-350.

- [275] W. N. Vreeland, G. W. Slater, A. E. Barron, **Profiling Solid-Phase Synthesis Products by Free-Solution Conjugate Capillary Electrophoresis**, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 663-670.
- [276] T. Krishnamurthy, P. L. Ross, **Rapid Identification of Bacteria by Mass Spectrometry**, *US 6177266 B1*, **2001**.
- [277] A. A. Herskovits, A. Seluanov, R. Rajsbaum, C. M. ten Hagen-Jongman, T. Henrichs, E. S. Bochkareva, G. J. Phillips, F. J. Probst, T. Nakae, M. Ehrmann, J. Luirink, E. Bibi, **Evidence for coupling of membrane targeting and function of the signal recognition particle (SRP) receptor FtsY**, *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 1040-1046.
- [278] I. Fritz (i.fritz@roboklon.de) 2013. Re: *TEV Protease [E-Mail]*. Nachricht an M. Meißler (maria.meissler@chemie.hu-berlin.de). Gesendet am 15.01.2013 um 16:06 Uhr.
- [279] L. Michaelis, M. L. Menten, **Die Kinetik der Invertinwirkung**, *Biochem. Z.* **1913**, 333-369.
- [280] A. Cornish-Bowden, **One hundred years of Michaelis-Menten kinetics**, *Perspectives in Science* **2015**, *4*, 3-9.
- [281] D. Voet, J. G. Voet, in *Biochemistry: Chapter 14 – Rates of Enzymatic Reactions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Hoboken [NJ, United States], **2004**, pp. 472-495.
- [282] M. Meißler, **Ein Modellsystem zur Semi-Biosynthese von Peptid-Polymer-Konjugaten**, *Diploma Thesis*, Humboldt-Universität zu Berlin, **2011**.
- [283] L. Vroman, A. L. Adams, **Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces**, *Surf. Sci.* **1969**, *16*, 438-446.
- [284] B. Lassen, M. Malmsten, **Competitive protein adsorption at plasma polymer surfaces**, *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *186*, 9-16.
- [285] A. L. Robert, in *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering: Biomaterials: Protein-Surface Interactions*, 2nd ed. (Eds.: G. E. Wnek, G. L. Bowlin), CRC Press [Informa Health Care USA, Inc.], New York [NY, United States], **2008**, pp. 270-284.
- [286] S. L. Hirsh, D. R. McKenzie, N. J. Nosworthy, J. A. Denman, O. U. Sezerman, M. M. M. Bilek, **The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates**, *Colloids Surf. B* **2013**, *103*, 395-404.
- [287] H. Elwing, A. Askendal, I. Lundström, in *Pathogenesis of Wound and Biomaterial-Associated Infections: Plasmaprotein Adsorption on Solid Surfaces. Some New Methods*, 1st ed. (Eds.: T. Wadström, I. Eliasson, I. Holder, Å. Ljungh), Springer-Verlag London, London [United Kingdom], **1990**, pp. 221-232.
- [288] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, **Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces**, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 87-106.
- [289] F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, B. Kasemo, **Energy Dissipation Kinetics for Protein and Antibody–Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance**, *Langmuir* **1998**, *14*, 729-734.
- [290] M. Tagaya, T. Ikoma, N. Hanagata, J. Tanaka, **Analytical Investigation of Protein Mediation Between Biomaterials and Cells**, *Mater. Express* **2012**, *2*, 1-22.
- [291] W. Y. X. Peh, E. Reimhult, H. F. Teh, J. S. Thomsen, X. Su, **Understanding Ligand Binding Effects on the Conformation of Estrogen Receptor α -DNA Complexes: A Combinational Quartz Crystal Microbalance with Dissipation and Surface Plasmon Resonance Study**, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 4415-4423.
- [292] G. Radicioni, R. Cao, J. Carpenter, A. A. Ford, T. T. Wang, Y. Li, M. Kesimer, **The innate immune properties of airway mucosal surfaces are regulated by dynamic interactions between mucins and interacting proteins: the mucin interactome**, *Mucosal Immunol.* **2016**.

- [293] J. P. Frohnmayer, D. Brüggemann, C. Eberhard, S. Neubauer, C. Mollenhauer, H. Boehm, H. Kessler, B. Geiger, J. P. Spatz, **Minimal Synthetic Cells to Study Integrin-Mediated Adhesion**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12472-12478.
- [294] J. P. Frohnmayer, D. Brüggemann, C. Eberhard, S. Neubauer, C. Mollenhauer, H. Boehm, H. Kessler, B. Geiger, J. P. Spatz, **Synthetische Adhäsion von Integrin-Liposomen als minimales Zellmodell**, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12649-12655.
- [295] L. Müller, S. Sinn, H. Drechsel, C. Ziegler, H.-P. Wendel, H. Northoff, F. K. Gehring, **Investigation of Prothrombin Time in Human Whole-Blood Samples with a Quartz Crystal Biosensor**, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 658-663.
- [296] Y. Hu, J. Jin, Y. Han, J. Yin, W. Jiang, H. Liang, **Study of fibrinogen adsorption on poly(ethylene glycol)-modified surfaces using a quartz crystal microbalance with dissipation and a dual polarization interferometry**, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 7716-7724.
- [297] N. Chandrasekaran, S. Dimartino, C. J. Fee, **Study of the adsorption of proteins on stainless steel surfaces using QCM-D**, *Chem. Eng. Res. Des.* **2013**, *91*, 1674-1683.
- [298] I. Reviakine, D. Johannsmann, R. P. Richter, **Hearing What You Cannot See and Visualizing What You Hear: Interpreting Quartz Crystal Microbalance Data from Solvated Interfaces**, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8838-8848.
- [299] M. N. Sela, L. Badihi, G. Rosen, D. Steinberg, D. Kohavi, **Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces**, *Clin. Oral Impl. Res.* **2007**, *18*, 630-638.
- [300] H. A. Krebs, **Chemical Composition of Blood Plasma and Serum**, *Annu. Rev. Biochem.* **1950**, *19*, 409-430.
- [301] M. Dockal, D. C. Carter, F. Rüker, **The Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin: STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND LIGAND BINDING PROPERTIES**, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303-29310.
- [302] T. Peters Jr., in *All About Albumin: Chapter 2 – The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties*, 1st ed., Academic Press [Elsevier Inc.], San Diego [CA, United States] – London [United Kingdom], **1996**, pp. 9-75.
- [303] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, **Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins**, *Mol. Immunol.* **2012**, *52*, 174-182.
- [304] A. Salis, M. Boström, L. Medda, F. Cugia, B. Barse, D. F. Parsons, B. W. Ninham, M. Monduzzi, **Measurements and Theoretical Interpretation of Points of Zero Charge/Potential of BSA Protein**, *Langmuir* **2011**, *27*, 11597-11604.
- [305] L. Medda, B. Barse, F. Cugia, M. Boström, D. F. Parsons, B. W. Ninham, M. Monduzzi, A. Salis, **Hofmeister Challenges: Ion Binding and Charge of the BSA Protein as Explicit Examples**, *Langmuir* **2012**, *28*, 16355-16363.
- [306] L. Medda, M. Monduzzi, A. Salis, **The molecular motion of bovine serum albumin under physiological conditions is ion specific**, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6663-6666.
- [307] S. Servagent-Noinville, M. Revault, H. Quiquampoix, M. H. Baron, **Conformational Changes of Bovine Serum Albumin Induced by Adsorption on Different Clay Surfaces: FTIR Analysis**, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *221*, 273-283.
- [308] H. T. M. Phan, S. Bartelt-Hunt, K. B. Rodenhausen, M. Schubert, J. C. Bartz, **Investigation of Bovine Serum Albumin (BSA) Attachment onto Self-Assembled Monolayers (SAMs) Using Combinatorial Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D) and Spectroscopic Ellipsometry (SE)**, *PLoS One* **2015**, *10*, e0141282.

- [309] B. Feng, J. Weng, B. C. Yang, J. Y. Chen, J. Z. Zhao, L. He, S. K. Qi, X. D. Zhang, **Surface characterization of titanium and adsorption of bovine serum albumin**, *Mater. Charact.* **2002**, *49*, 129-137.
- [310] Y. M. Efimova, S. Haemers, B. Wierczinski, W. Norde, A. A. v. Well, **Stability of globular proteins in H₂O and D₂O**, *Biopolymers* **2007**, *85*, 264-273.
- [311] K.-I. Sano, K. Ajima, K. Iwahori, M. Yudasaka, S. Iijima, I. Yamashita, K. Shiba, **Endowing a Ferritin-Like Cage Protein with High Affinity and Selectivity for Certain Inorganic Materials**, *Small* **2005**, *1*, 826-832.
- [312] M. Yoshinari, T. Kato, K. Matsuzaka, T. Hayakawa, K. Shiba, **Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides**, *Biofouling* **2010**, *26*, 103-110.
- [313] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, **On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon**, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 233-244.
- [314] P. Roach, D. Farrar, C. C. Perry, **Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes**, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8168-8173.
- [315] M. P. Gispert, A. P. Serro, R. Colaço, B. Saramago, **Bovine serum albumin adsorption onto 316L stainless steel and alumina: a comparative study using depletion, protein radiolabeling, quartz crystal microbalance and atomic force microscopy**, *Surf. Interface Anal.* **2008**, *40*, 1529-1537.
- [316] U. O. S. Seker, B. Wilson, D. Sahin, C. Tamerler, M. Sarikaya, **Quantitative Affinity of Genetically Engineered Repeating Polypeptides to Inorganic Surfaces**, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 250-257.
- [317] K. Y. Foo, B. H. Hameed, **Insights into the modeling of adsorption isotherm systems**, *Chem. Eng. J.* **2010**, *156*, 2-10.
- [318] A. Santos, F. C. Carvalho, M.-C. Roque-Barreira, A. L. Zorzetto-Fernandes, D. Gimenez-Romero, I. Monzó, P. R. Bueno, **Evidence for Conformational Mechanism on the Binding of TgMIC4 with β -Galactose-Containing Carbohydrate Ligand**, *Langmuir* **2015**, *31*, 12111-12119.
- [319] I. Langmuir, **THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS**, *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 2221-2295.
- [320] D. S. Karpovich, G. J. Blanchard, **Direct Measurement of the Adsorption Kinetics of Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers on a Microcrystalline Gold Surface**, *Langmuir* **1994**, *10*, 3315-3322.
- [321] J. P. Tam, Y.-A. Lu, **Coupling Difficulty Associated with Interchain Clustering and Phase Transition in Solid Phase Peptide Synthesis**, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12058-12063.
- [322] K. Sadler, J. P. Tam, **Peptide dendrimers: applications and synthesis**, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 195-229.
- [323] L. Bracci, C. Falciani, B. Lelli, L. Lozzi, Y. Runci, A. Pini, M. G. De Montis, A. Tagliamonte, P. Neri, **Synthetic Peptides in the Form of Dendrimers Become Resistant to Protease Activity**, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46590-46595.
- [324] C. Falciani, L. Lozzi, A. Pini, F. Corti, M. Fabbrini, A. Bernini, B. Lelli, N. Niccolai, L. Bracci, **Molecular Basis of Branched Peptides Resistance to Enzyme Proteolysis**, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69*, 216-221.
- [325] R. K. Scopes, in *Encyclopedia of Life Sciences: Enzyme Activity and Assays*, Nature Publishing Group [John Wiley & Sons, Ltd.], London [United Kingdom] – New York [NY, United States] – Chichester [United Kingdom], **2002**.

- [326] D. Mikolajzak, **Photochemische Aktivierung peptidbasierter Adhäsionsdomänen**, *Bachelor Thesis*, Humboldt-Universität zu Berlin, 2014.
- [327] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, **Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy**, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119-191.
- [328] C. Zhu, C. Ninh, C. J. Bettinger, **Photoreconfigurable Polymers for Biomedical Applications: Chemistry and Macromolecular Engineering**, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3474-3494.
- [329] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, **Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry**, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2158.
- [330] J. E. T. Corrie, T. Furuta, R. S. Givens, A. L. Yousef, M. Goeldner, in *Dynamic Studies in Biology: Chapter 1 – Photoremovable Protecting Groups Used for the Caging of Biomolecules*, 1st ed. (Eds.: M. Goeldner, R. S. Givens), Wiley-VCH Verlag, Weinheim [Germany], **2005**, pp. 1-94.
- [331] A. Deiters, **Principles and Applications of the Photochemical Control of Cellular Processes**, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 47-53.
- [332] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, **Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analog - Utilization by Na-K Pump of Human Red Blood-Cell Ghosts**, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929-1935.
- [333] G. Mayer, A. Heckel, **Biologically Active Molecules with a "Light Switch"**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900-4921.
- [334] G. Mayer, A. Heckel, **Biologisch aktive Moleküle mit "Lichtschalter"**, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020-5042.
- [335] B. B. Brown, D. S. Wagner, H. M. Geysen, **A single-bead decode strategy using electrospray ionization mass spectrometry and a new photolabile linker: 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)propionic acid**, *Mol. Diversity* **1995**, *1*, 4-12.
- [336] R. L. Willett, K. W. Baldwin, K. W. West, L. N. Pfeiffer, **Differential adhesion of amino acids to inorganic surfaces**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 7817-7822.
- [337] S. V. Patwardhan, G. Patwardhan, C. C. Perry, **Interactions of biomolecules with inorganic materials: principles, applications and future prospects**, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2875-2884.
- [338] B. O. Keller, J. Sui, A. B. Young, R. M. Whittall, **Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry**, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *627*, 71-81.
- [339] C. Oliyai, R. T. Borchardt, **Chemical Pathways of Peptide Degradation. IV. Pathways, Kinetics, and Mechanism of Degradation of an Aspartyl Residue in a Model Hexapeptide**, *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 95-102.
- [340] B. Paizs, S. Suhai, **Fragmentation pathways of protonated peptides**, *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 508-548.
- [341] C. G. Bochet, **Photolabile protecting groups and linkers**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 125-142.
- [342] D. D. Young, A. Deiters, **Photochemical control of biological processes**, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 999-1005.
- [343] K. Katayama, S. Tsukiji, T. Furuta, T. Nagamune, **A bromocoumarin-based linker for synthesis of photocleavable peptidoconjugates with high photosensitivity**, *Chem. Commun.* **2008**, 5399-5401.
- [344] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, **Light-Controlled Tools**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446-8476.

- [345] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, **Lichtgesteuerte Werkzeuge**, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8572-8604.
- [346] K. E. Bremmell, P. Kingshott, Z. Ademovic, B. Winther-Jensen, H. J. Griesser, **Colloid Probe AFM Investigation of Interactions between Fibrinogen and PEG-Like Plasma Polymer Surfaces**, *Langmuir* **2006**, 22, 313-318.
- [347] D. Pussak, **Synthesis and Functionalization of Soft Colloidal Probes based on Poly(ethylene glycol) as Carbohydrate Biosensors**, *Inaugural-Dissertation*, Freie Universität Berlin, Berlin [Germany], **2014**.
- [348] W. Lee, D. Choi, Y. Lee, D.-N. Kim, J. Park, W.-G. Koh, **Preparation of micropatterned hydrogel substrate via surface graft polymerization combined with photolithography for biosensor application**, *Sens. Actuators B* **2008**, 129, 841-849.
- [349] E. T. Kang, K. L. Tan, K. Kato, Y. Uyama, Y. Ikada, **Surface Modification and Functionalization of Polytetrafluoroethylene Films**, *Macromolecules* **1996**, 29, 6872-6879.
- [350] Z. W. Ma, M. Kotaki, S. Ramakrishna, **Surface modified nonwoven polysulphone (PSU) fiber mesh by electrospinning: A novel affinity membrane**, *J. Membrane Sci.* **2006**, 272, 179-187.
- [351] A. Song, J. Zhang, C. B. Lebrilla, K. S. Lam, **A Novel and Rapid Encoding Method Based on Mass Spectrometry for "One-Bead-One-Compound" Small Molecule Combinatorial Libraries**, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6180-6188.
- [352] A. Soriano, R. Ventura, A. Molero, R. Hoen, V. Casadó, A. Cortés, F. Fanelli, F. Albericio, C. Lluís, R. Franco, M. Royo, **Adenosine A2A Receptor-Antagonist/Dopamine D2 Receptor-Agonist Bivalent Ligands as Pharmacological Tools to Detect A2A-D2 Receptor Heteromers**, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 5590-5602.
- [353] S. Liebert, **Elastische Kolloidpartikel als Sonden für die Analyse enzymatisch-aktivierbarer Adhäsion**, *Diploma Thesis*, Humboldt-Universität zu Berlin, **2014**.
- [354] L. Chen, I. Annis, G. Barany, in *Current Protocols in Protein Science: UNIT 18.6 – Disulfide Bond Formation in Peptides* (Eds.: J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, P. T. Wingfield), John Wiley & Sons, Hoboken [NJ], United States], **2001**.
- [355] O. Koniev, A. Wagner, **Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation**, *Chem. Soc. Rev.* **2015**.
- [356] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, **Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine**, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2648-2650.
- [357] A. Lees, D. E. Shafer, J. K. Inman, **Reaction of tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with maleimide and alpha-haloacyl groups: Anomalous elution of TCEP by gel filtration**, *Anal. Biochem.* **2000**, 282, 161-164.
- [358] K. Tyagarajan, E. Pretzer, J. E. Wiktorowicz, **Thiol-reactive dyes for fluorescence labeling of proteomic samples**, *Electrophoresis* **2003**, 24, 2348-2358.
- [359] A. Sanchez, E. Pedroso, A. Grandas, **Oligonucleotide cyclization: the thiol-maleimide reaction revisited**, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 309-311.
- [360] B. Pal, P. K. Pradhan, P. Jaisankar, V. S. Giri, **First Triphenylphosphine Promoted Reduction of Maleimides to Succinimides**, *Synthesis* **2003**, 2003, 1549-1552.
- [361] G. Miralles, P. Verdié, K. Puget, A. Maurras, J. Martinez, G. Subra, **Microwave-Mediated Reduction of Disulfide Bridges with Supported (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) as Resin-Bound Reducing Agent**, *ACS Comb. Sci.* **2013**, 15, 169-173.

- [362] F. Rashid, S. Sharma, B. Bano, **Comparison of Guanidine Hydrochloride (GdnHCl) and Urea Denaturation on Inactivation and Unfolding of Human Placental Cystatin (HPC)**, *Protein J.* **2005**, *24*, 283-292.
- [363] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, **Chemistry for peptide and protein PEGylation**, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 459-476.
- [364] S. Matsui, H. Aida, **Hydrolysis of some N-alkylmaleimides**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1978**, 1277-1280.
- [365] Y. Chisti, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology: Mass Transfer* (Eds.: O. Kirk, T. Damhus, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang, H. S. Olsen, T. T. Hansen, H. Lund, H. E. Schiff, L. K. Nielsen), John Wiley & Sons, **2000**.
- [366] J. Kress, R. Zanaletti, A. Amour, M. Ladlow, J. G. Frey, M. Bradley, **Enzyme Accessibility and Solid Supports: Which Molecular Weight Enzymes Can Be Used on Solid Supports? An Investigation Using Confocal Raman Microscopy**, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3769-3772.
- [367] M. Maier, N. Kotman, C. Friedrichs, J. Andrieu, M. Wagner, R. Graf, W. S. L. Strauss, V. Mailander, C. K. Weiss, K. Landfester, **Highly Site Specific, Protease Cleavable, Hydrophobic Peptide-Polymer Nanoparticles**, *Macromolecules* **2011**, *44*, 6258-6267.
- [368] D. W. Anderson, G. J. Cotton, A. M. Hay, P. W. Armstrong, I. Wilson, **Purification tags of synthetic peptides and proteins**, *PCT Application No.: PCT/GB2011/000363* **2011**.
- [369] R. R. Abzalimov, A. Frimpong, I. A. Kaltashov, **Structural characterization of protein-polymer conjugates. I. Assessing heterogeneity of a small PEGylated protein and mapping conjugation sites using ion exchange chromatography and top-down tandem mass spectrometry**, *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *312*, 135-143.
- [370] D. Piskiewicz, M. Landon, E. L. Smith, **Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *40*, 1173-1178.
- [371] J. Vlasak, R. Ionescu, **Fragmentation of monoclonal antibodies**, *mAbs* **2011**, *3*, 253-263.
- [372] R. C. Stephenson, S. Clarke, **Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins**, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6164-6170.
- [373] N.-J. Cho, C. W. Frank, B. Kasemo, F. Höök, **Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates**, *Nat. Protocols* **2010**, *5*, 1096-1106.
- [374] A. K. Dutta, G. Belfort, **Adsorbed gels versus brushes: Viscoelastic differences**, *Langmuir* **2007**, *23*, 3088-3094.
- [375] G. Z. Gao, K. Yu, J. Kindrachuk, D. E. Brooks, R. E. W. Hancock, J. N. Kizhakkedathu, **Antibacterial Surfaces Based on Polymer Brushes: Investigation on the Influence of Brush Properties on Antimicrobial Peptide Immobilization and Antimicrobial Activity**, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3715-3727.
- [376] G. Gao, J. T. J. Cheng, J. Kindrachuk, R. E. W. Hancock, S. K. Straus, J. N. Kizhakkedathu, **Biomembrane Interactions Reveal the Mechanism of Action of Surface-Immobilized Host Defense IDR-1010 Peptide**, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 199-209.
- [377] E. G. Bellomo, P. Davidson, M. Impérator-Clerc, T. J. Deming, **Aqueous Cholesteric Liquid Crystals Using Uncharged Rodlike Polypeptides**, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9101-9105.
- [378] A. Song, X. Wang, J. Zhang, J. Mařík, C. B. Lebrilla, K. S. Lam, **Synthesis of hydrophilic and flexible linkers for peptide derivatization in solid phase**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 161-165.

- [379] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, **NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist**, *Organometallics* **2010**, 29, 2176-2179.
- [380] K. Morand, G. Talbo, M. Mann, **Oxidation of peptides during electrospray ionization**, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 738-743.
- [381] C. Spiess, H. P. Happersberger, M. O. Glocker, E. Spiess, K. Rippe, M. Ehrmann, **Biochemical characterization and mass spectrometric disulfide bond mapping of periplasmic alpha-amylase MalS of Escherichia coli**, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22125-22133.
- [382] H. M. Yang, N. Liu, X. Y. Qiu, S. Y. Liu, **A New Method for Analysis of Disulfide-Containing Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Mass Spectrometry**, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2009**, 20, 2284-2293.
- [383] **Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides**, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37.

Kapitel 7

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2ME	2-Mercaptoethanol
α CHCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
ATRP	engl. <i>atom transfer radical polymerization</i>
AMPs	antimikrobielle Peptide (engl. <i>antimicrobial peptides</i>)
ANP	3-Amino-3-(2-nitrobenzyl)propionsäure
APT	engl. <i>attached proton test</i>
Äq.	Äquivalent(e)
BEH	engl. <i>ethylene bridged hybrid</i>
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CA	Crotonsäure (engl. <i>crotonic acid</i>)
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzymklassifizierung (engl. <i>Enzyme Commission number</i>)
EDT	1,2-Ethandithiol
ERMs	enzymresponsive Materialien (engl. <i>enzyme-responsive materials</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation (engl. <i>electrospray ionization</i>)
EtOAc	Essigsäureethylester
FD	Funktionalisierungsgrad (engl. <i>functionalization degree</i>)
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (engl. <i>fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
gef.	gefunden

Gu·HCl	Guanidinhydrochlorid
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HS	Homoserin-Lacton
HSL	Homoserin
IF	Suppressionsdomäne (engl. <i>interfering domain</i>)
IEP	isoelektrischer Punkt (engl. <i>isoelectric point</i>)
IMAC	Metallchelatchromatographie (engl. <i>immobilised-metal affinity chromatography</i>)
JKR	John-Kendal-Roberts-Theorie/-Modell
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
Mal	Maleinimid
MALDI-ToF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse (engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight</i>)
MeCN	Acetonitril
MMP-1	Matrix-Metalloprotease 1
MS	Massenspektrometrie (engl. <i>mass spectrometry</i>)
<i>n</i> Bu	<i>n</i> -Butyl
NIa	engl. <i>nuclear inclusion protein Ia</i>
NMR	kernmagnetische Resonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NMP	engl. <i>nitroxide-mediated polymerization</i> oder N-Methyl-2-pyrrolidon
OEG	Oligo(ethylenglycol)
ONB	<i>ortho</i> -Nitrobenzyl
OSu	O-Succinimid
PAP	engl. <i>PEG-attached peptide (resin)</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDA	Photodiodenarray
PDB ID	engl. <i>Protein Data Bank identification code</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PEG	Poly(ethylenglycol)
PLL	Poly-L-Lysin
<i>Pn</i> BA	Poly(<i>n</i> -butylacrylat)
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamid)
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
QCM-D	Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsaufzeichnung (engl. <i>quartz crystal microbalance with dissipation monitoring</i>)

RAFT	engl. <i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i>
R _F	Retentionsfaktor (engl. <i>retarding-front</i>)
RhB	Rhodamin B
RICM	Interferenzreflexionsmikroskopie (engl. <i>reflection interference contrast microscopy</i>)
RP	Umkehrphase (engl. <i>reversed-phase</i>)
SAMs	selbstorganisierte Monolagen (engl. <i>self-assembled monolayers</i>)
SCPs	elastische Hydrogelsonden (engl. <i>soft colloidal probes</i>)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SPAAC	engl. <i>strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i>
SPPS	festphasengebundene Peptidsynthese (engl. <i>solid-phase peptide synthesis</i>)
S RAM	Standard-Rinkamid (engl. <i>standard rink amide</i>)
TBO	Toluidinblau O
TBP	titanbindendes Peptid (engl. <i>Ti-binding peptide</i>)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TES	Triethylsilan
TEV	Tabakätzvirus (engl. <i>tobacco etch virus</i>)
TFA	Trifluoressigsäure (engl. <i>trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TMSBr	Bromtrimethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Triphenylmethyl (Trityl)
UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>ultra-high performance liquid chromatography</i>)
UV-Vis	ultraviolette und sichtbare elektromagnetische Strahlung (engl. <i>ultraviolet-visible</i>)

Die Aminosäuren wurden gemäß des Drei- und Einbuchstabencodes der IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) angegeben.^[383] Soweit nicht anders vermerkt, liegen diese in der L-Konfiguration vor.

PUBLIKATIONSLISTE

FACHARTIKEL

- 2016 M. Meißler, A. Taden, H. G. Börner, **Enzyme-Triggered Antifouling Coatings: Switching Bioconjugate Adsorption via Proteolytically Cleavable Interfering Domains**, *ACS Macro Lett.* **2016**, 5, 583-587. DOI: [10.1021/acsmacrolett.6b00072](https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.6b00072)
- 2012 T. Pauloehrl, G. Delaittre, M. Bruns, M. Meißler, H. G. Börner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, **(Bio)molecular Surface Patterning by Photo-Triggered Oxime Ligation**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 9181-9184. DOI: [10.1002/anie.201202684](https://doi.org/10.1002/anie.201202684)

BUCHKAPITEL

- 2017 M. Meißler, S. Wieczorek, N. ten Brummelhuis, H. G. Börner, in *RSC Polymer Chemistry Series No. 22: Bio-inspired Polymers: Synthetic Aspects of Peptide- and Protein-Polymer Conjugates in the Post-click Era*, Eds.: N. Bruns, A. F. M. Kilbinger, *Royal Society of Chemistry: Cambridge [UK]*, **2017**, pp. 1-30. DOI: [10.1039/9781782626664-00001](https://doi.org/10.1039/9781782626664-00001)

PATENTE

- 2015 A. Taden, K. Landfester, R. Breves, H. G. Börner, L. Breucker, C. Kastner, B. Veith, M. Meißler, H. Keller, **Aqueous Peptide-Functionalized Polyurethane Dispersions**. *European Patent Application EP 3 061 776 A1*.

KONFERENZBEITRÄGE

Vorträge

- 2015 M. Meißler, A. Taden, H. G. Börner, **Enzyme-Triggered Bioconjugate Adhesion Using Proteolytically Cleavable Peptide Domains**, *Functional Polymers at Bio-Material Interfaces – 79th Prague Meeting on Macromolecules [CZE]*.
- 2014 M. Meißler, A. Taden, H. G. Börner, **Enzymatic Regulation of Bioconjugate Adhesion via Proteolytically Cleavable Peptide Domains**, *3. Berliner Chemie Symposium [GER]*.

Posterpräsentationen

- 2013 M. Meißler, A. Taden, H. G. Börner, **Enzymatic Regulation of Adhesive Functions of Peptide-Polymer Conjugates**, *15. JCF Frühjahrssymposium [GER]*.

Berlin, 24. Oktober 2017

Ort, Datum

Unterschrift Antragsteller

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Maria Meißler, die vorliegende Arbeit selbstständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet.

Berlin, 24. Oktober 2017
Ort, Datum

Unterschrift Antragsteller